

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN
LYNGBY

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

G. PIEKARSKI
BONN

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

H. G. SCHLEGEL
GÖTTINGEN

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

T. WIKÉN
DELFT

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

38. BAND



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1960/61

Alle Rechte, einschließlich das der Übersetzung in fremde Sprachen und das der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung, vorbehalten. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0,30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Springer-Verlag OHG / Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH, Wiesbaden

Inhaltsverzeichnis des 38. Bandes

1. Heft

(Abgeschlossen am 17. Dezember 1960)

	Seite
SCHLEGEL, H. G., und N. PFENNIG, Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien. Mit 12 Textabbildungen.	1
STELLMACH-HELWIG, R., Morphologische und physiologische Eigenschaften einiger aus Schafpannen isolierter Bakterienstämme. Mit 5 Textabbildungen	40
SCHLEGEL, H. G., und R. LAFFERTY, Radioaktivitätsmessung an Einzellern auf Membranfiltern. Mit 2 Textabbildungen.	52
SCHLEGEL, H. G., R. LAFFERTY und R. STELLMACH-HELWIG, Quantitative Messungen über den CO ₂ -Einbau an organotrophen Bakterien. Mit 6 Textabbildungen	55
RÖSCH, R., Untersuchungen über den Ligninabbau und über die Oxydasen von Braun- und Weißfäulepilzen. Mit 5 Textabbildungen.	73

2. Heft

(Abgeschlossen am 28. Dezember 1960)

NATHAN, H. H., Effect of Nutritional Deficiencies on Synthesis of the Inducible Malic Enzyme of <i>Lactobacillus plantarum</i> . With 4 Figures in the Text. .	107
SPRECHER, E., Über die Stoffausscheidung bei Pilzen. I	114
RYDIN, C., Studies on Fermentation Processes in Silage. Malt as a Supplement in Biological Ensiling.	156
PRELL, H., Analyse des Lysogenisierungsvorganges im System <i>Salmonella typhimurium</i> -Phage P 22 mit Hilfe von UV-Bestrahlung. Mit 8 Textabbildungen	171

3. Heft

(Abgeschlossen am 23. Februar 1961)

MACHER, F., und E. MANNINGER, Die Verwendung der Spektrochemie zur Bestimmung der Zusammensetzung von Bakterien. Mit 2 Textabbildungen. .	201
SCHLEGEL, H. G., H. KALTWASSER und G. GOTTSCHALK, Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Mit 7 Textabbildungen	209
SIEFFERT-GRETCHMANN, G., Studien über die Adsorption und Injektion von durch Protamin inaktivierten T 5-Phagen. Mit 1 Textabbildung	223
ZETSCHKE, K., Chemisch-Physiologische Untersuchungen über die Hydroxylierung von Steroiden durch Pilze der Gattung <i>Curvularia</i> . Mit 12 Textabbildungen	237
CANTINO, E. C., and G. TURIAN, A Role for Glycine in Light stimulated Nucleic Acid Synthesis by <i>Blastocladiella emersonii</i> . With 3 Figures in the Text	272
TOLBA, M. K., and A. M. SALAMA, Effect of Dihydrostreptomycin on the Growth and Carbohydrate Metabolism of Mycelial Mats of <i>Rhizoctonia solani</i> . With 1 Figure in the Text	283

4. Heft

(Abgeschlossen am 15. März 1961)

	Seite
TOLBA, M. K., and A. M. SALAMA, On the Mechanism of Sucrose Utilisation by Mycelial Felts of <i>Rhizoctonia solani</i> . II. Effects of Glucose, Fructose, Silver Nitrate, Sodium Fluoride and Preheating of Mycelial Mats on Sucrose Utilisation. With 2 Figures in the Text.	289
SPRECHER, E., Über die Stoffausscheidung bei Pilzen. II. Die Ausscheidung sekundärer Stoffwechselprodukte. Mit 2 Textabbildungen.	299
BACHMANN, E., und H. ZÄHNER, Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 28. Mitteilung, Die „in vitro“-Resistenz gegen Ferrimycin. Mit 5 Textabbildungen.	326
SKINNER, F. A., and N. WALKER, Growth of <i>Nitrosomonas europaea</i> in batch and continuous culture. With 7 Figures in the Text	339
WEIGL, J., Über den Stoffwechsel und die Cellulosesynthese von <i>Acetobacter xylinum</i> (Brown) Holland. Mit 1 Textabbildung.	350
HÜTTER, R., Zur Systematik der Actinomyceten. 5. Die Art <i>Streptomyces albus</i> (Rossi-Doria emend. Krainsky) Waksman et Henrici 1943. Mit 2 Textabbildungen	367
KREMPL-LAMPRECHT, L., Über die Besiedelung der Autolyseprodukte des Echten Hausschwamms durch Successionspilze aus der Gattung <i>Scopulariopsis</i> . I. Teil.	384
SCHMIDT, K., Ein atypischer Stamm von <i>Pseudomonas iodinum</i>	408
WEIGL, J., Zum Mechanismus des enzymatischen Celluloseabbaus durch <i>Mecurilius lacrymans</i> (Wulf.) Fr. Mit 5 Textabbildungen	411
Autorenverzeichnis.	419

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien *

Von

H. G. SCHLEGEL und N. PFENNIG

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Juli 1960)

Als Schüler von J. BUDER hatte der eine von uns die großen Schwefelpurpurbakterien *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* kennengelernt und an ihnen reizphysiologische Untersuchungen angestellt (SCHLEGEL 1950, 1956). Da es noch nicht gelungen war, diese zuerst von EHRENBURG (1838) beschriebenen Organismen dauernd in Kultur zu halten, wurde das für die Untersuchungen benötigte Zellmaterial laufend von einem an diesen Organismen reichen Standort, einem Teich in Ostrau bei Halle, entnommen und einige Wochen in Vorrats-Standgefäßen am Licht gehalten.

Die ausnehmende Größe und prächtige Färbung dieser Purpurbakterien, ihr wechselnder Gehalt an stark lichtbrechenden Schwefeltröpfchen, ihre Beweglichkeit und ihr phototaktisches Verhalten lassen sie dem Biologen zu unvergeßlichen Studienobjekten werden. Es verwundert deshalb nicht, daß immer wieder versucht worden ist, diese Organismen nicht nur am natürlichen Standort zu beobachten, sondern ihnen im Laboratorium in Dauer- und Reinkulturen Entwicklungsmöglichkeiten zu bieten. Solche Versuche führten bisher nicht zum Ziel. Diesen Umstand hat für die Thiospirillen unlängst VAN NIEL, der beste Kenner der Purpurbakterien und ihrer Ökologie, herausgestellt:

„At present we are . . . completely ignorant of the factors that permit the occasionally observed mass development of the red sulphur spirilla. A more complete knowledge of their ecology should go far towards solving the problem of culturing these interesting organisms; as far as I know, not a single representative of this group has yet been isolated in pure culture, nor has it been possible even to propagate them in the laboratory in crude cultures“ (VAN NIEL 1955). Diese auf *Thiospirillum jenense* und seine Verwandten abzielenden Bemerkungen gelten für die großen Chromatien ebenfalls.

* Herrn Prof. Dr. J. BUDER zum 75. Geburtstag gewidmet.

Soweit bisher Untersuchungen über den Stoffwechsel, die Beweglichkeit und das reizphysiologische Verhalten dieser Formen vorliegen, wurden sie an Standortmaterial vorgenommen, das im günstigsten Falle über mehrere Monate hinweg in Rohkulturen am Leben erhalten wurde (WINOGRADSKY 1887, 1888; BEIJERINCK 1893; BUDER 1915, 1919; SCHLEGEL 1950).

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis von Beobachtungen am Standort und an Laboratoriumskulturen sowie von Kulturversuchen. Sie führte zur Ausarbeitung spezifisch-selektiver Anreicherungsbedingungen für *Chromatium okenii*, *Chromatium warmingii* und *Thiospirillum jenense*.

I. Organismen

Chromatien und Thiospirillen sind die Prototypen der *Thiorhodaceae*. *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* wurden zusammen mit *Chromatium rubescens* und *Chromatium vinosum* in Ziegenhain bei Jena von EHRENBURG entdeckt und in seinem Werke „Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen“ (1838) beschrieben. Die beiden erstgenannten Formen sind nicht nur die größten unter den Purpurbakterien, sondern gehören zu den Riesen unter den Bakterien — „Mammuth“ wie COHN 1875 es ausdrückt. Sie sind seither mehrfach aufgefunden, charakterisiert und untersucht worden (WINOGRADSKY 1887, 1888; BEIJERINCK 1893; BUDER 1915, 1919, 1920; BAVENDAMM 1924; VAN NIEL 1932; MANTEN 1942).

Die für die Gruppe kennzeichnende prächtige Färbung beruht auf dem Gehalt an Pigmenten, eines chlorophyllähnlichen blaugrünen und eines roten Farbstoffes, bei denen es sich um Bakteriochlorophyll (NOACK u. SCHNEIDER 1933; FISCHER, LAMBRECHT u. MITTENZWEI 1938; MITTENZWEI 1942) und ein Gemisch von Carotinoiden handelt (vgl. spektrale Absorptionskurven Abb. 4a—e).

Das zweite spezifische Merkmal dieser Organismen stellen die in H_2S -haltigen Medien auftretenden stark lichtbrechenden sphärischen Einschlüsse dar, bei denen es sich um Schwefelkugeln handelt, wie zuerst CRAMER (1870) an *Beggiatoa* und COHN (1875) an *Lamprocystis roseopersicina*, *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* nachgewiesen haben.

Chromatien und Thiospirillen sind mit einer aus einem Geißelbüschel bestehenden polaren Geißel aktiv beweglich. Sowohl am Kulminationspunkt ihrer Entwicklung am Standort als auch bei optimalem Wachstum im Kulturglas kommen alle Zellen zum Schwärmen; sie bilden „Wolken“, „Bakterienhorizonte“ oder „homogene Suspensionen“. Im Schwärmen kann man den physiologischen Normalzustand der Zellen sehen. Unter suboptimalen oder ungünstigen Wachstumsbedingungen treten anormal gestaltete Zellen auf, die sich in Form von Wandbelägen festsetzen oder Sedimente bilden (VAN NIEL 1932).

Nach den bisherigen Untersuchungen entwickeln sich die *Thiorhodaceae* unter anaeroben Bedingungen bei Vorhandensein von Schwefelwasserstoff und Kohlendioxyd im Licht; sie repräsentieren damit einen eigenen Stoffwechseltyp, der als Photoautotrophie (PRINGSHEIM 1932) oder Photolithotrophie (LWOFF u. Mitarb. 1946) bezeichnet worden ist. Einige Vertreter gedeihen auch unter Verwendung organischer Substrate; wie weit die Photoorganotrophie unter den *Thiorhodaceae* verbreitet ist, bleibt festzustellen. Einzelheiten über die Morphologie, Ökologie und Physiologie finden sich in den zusammenfassenden Darstellungen von BAVENDAMM (1924, 1934, 1936) und insbesondere vom Standpunkt einer vergleichenden Betrachtungsweise in den Schriften von VAN NIEL (1932, 1936, 1941, 1949, 1954).

Mit der Verwertung von Strahlungsenergie und der Beweglichkeit steht die Lichtreizbarkeit der Purpurbakterien im Zusammenhang. Ein eigenartiger Mechanismus, auf eine Herabsetzung der Lichtintensität mit einer Schlagumkehr der Geißel zu reagieren, führt sie bei ihrem planlosen Umherschwimmen immer wieder ins Licht zurück. Diese phobophototaktische Reaktionsweise ist seit ihrer Entdeckung an dem kleinen „*Bacterium photometricum*“ (ENGELMANN 1883, 1888) auch an den großen Schwefelpurpurbakterien mehrfach untersucht worden (BUDER 1915, 1919; SCHLEGEL 1950).

a) *Chromatium okenii* Perty

wurde von seinem Entdecker zu Ehren von L. OKEN als *Monas okenii* beschrieben „*Monas corpore cylindrico, aequabili, parumper curvato, ter quaterve longiore quam lato, utrinque rotundato, 1/192 lineae attingens, volutando procedens, vacillans, rubra; socialis*“ (1838) und später in *Chromatium okenii* umbenannt (PERTY 1852). Die schwach gekrümmten, etwa nierenförmigen Zellen sind 15–20 μ lang und 6 μ dick. Bei den von uns in Anreicherungskultur gezogenen Zellen (Abb. 1) streuten die Abmessungen zwischen 5–6,5 μ Dicke und 8–15 μ Länge; die größten waren kurz vor der Teilung 20–23 μ lang. Ihre Gestalt wird zum Teil durch den Gehalt an Schwefelkugeln bestimmt; sind sie damit reich versehen, so nehmen sie Tonnenform an. Im übrigen erwiesen sich die Zellen unter Bedingungen, bei denen sie wachsen und sich teilen, in ihrer Form und Größe als relativ konstant. Lediglich bei der Überführung in suboptimale oder unzuträgliche Nährlösungen kommt es zur Ausbildung von Riesenzellen oder spindelförmigen Involutionsformen.

Die Schwefelkugeln sind bei *Chromatium okenii* gleichmäßig über den Zellraum verteilt und weder wand- noch polständig. Man sieht häufiger wenige große als viele kleine Kugeln. Bei Belichtung in Gegenwart von Kohlendioxyd und unter Ausschluß von Schwefelwasserstoff verschwinden die Schwefelkugeln, und die Zellen erscheinen schlanker.

Die Zellen sind purpurrot gefärbt; Suspensionen von S-freien Zellen erschienen lackfarben, solche von S-haltigen pastellfarben oder — um einen treffenden Ausdruck VAN NIELS (1932) wiederzugeben — „kalkig“. Die Färbung ist so intensiv, daß selbst die Einzelzellen stark gefärbt erscheinen.

Die Zellen sind durch eine in gestrecktem Zustand etwa $25-30\mu$ lange Geißel, die ein Geißelbüschel von bis zu 40 Einzelgeißeln (BUDER 1915;

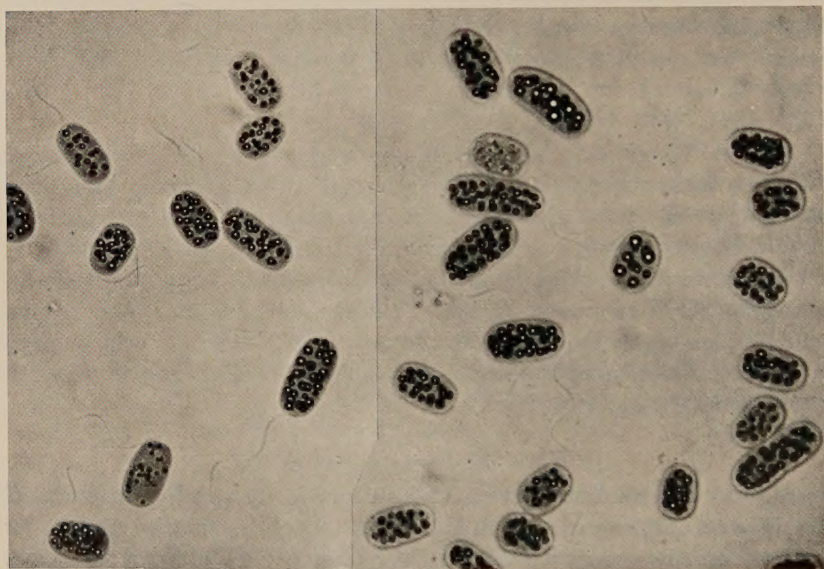


Abb.1. *Chromatium okenii* (Perty), Stamm Ostrau aus Klärschlamm-Anreicherungskultur. Hellfeld-Lebendaufnahme; Gesamtvergr. 960 mal

KOLKWITZ 1927) darstellt, beweglich. Die Geißel wirkt bei *Chromatium* als Schubgeißel. Die Stabilität der Vorwärtsbewegung ist gering; wie bei anderen polar begeißelten Bakterien entsteht das Bild einer taumelnden Bewegung. Wird durch einen Lichtreiz eine Umkehr der Schwimmrichtung bewirkt, so wird die Geißel dem Körper vorangetragen: die Geschwindigkeit dieser Rückwärtsbewegung ist viel geringer als die der Vorwärtsbewegung.

b) *Thiospirillum jenense* Winogradsky

wurde zusammen mit *Chromatium okenii* von EHRENBURG entdeckt und als *Ophidomonas jenensis* (Jenaische Schlangenmonade) beschrieben „*O. corpore spiraliter curvato tenuissimo, utroque fine aequaliter obtuso, 48vam lineae partem longo, olivaceofuscescente*“ (EHRENBURG 1838). Mit einem Durchmesser von $3,5-4,5\mu$ und einer Länge von $30-40\mu$ ist

Thiospirillum ein Riese unter den Bakterien. Sein Körper verläuft in einer Schraubenwindung und trägt am Hinterende eine kurze (13–14 μ lange) Geißel, die wie bei *Chromatium* aus einem Geißelschopf besteht, aber dicker und starrer ist. Der Körper ist hier ebenfalls mit Schwefelkugeln angefüllt, das Hinterende ein wenig zugespitzt und schwefelfrei (Abb. 2).

In rascher Entwicklung begriffene Kulturen enthalten vorwiegend kleine Zellformen von zwar demselben Durchmesser, aber nur der halben



Abb. 2. *Thiospirillum jenense* (Winogradsky), Stamm Ostrau aus Klärschlamm-Anreicherungskultur. Hellfeld-Lebendaufnahme; Gesamtvergr. 960 mal

Länge (Abb. 2). Der schwach gekrümmte, am Hinterende zugespitzte Organismus steht gestaltlich einem *Vibrio* näher als einem *Spirillum*.

Suspensionen von *Thiospirillum jenense* erscheinen pastellfarben-orangerbraun. Die Zellen sind weniger intensiv gefärbt als die von *Chromatium* und haben unter dem Mikroskop eine schwach grüngelbliche Tönung.

Die Geißel fungiert hier ebenfalls als Schubgeißel. Die Bewegung ist der von *Chromatium* ähnlich; jedoch ist die Stabilität der Bewegung auf Grund des Vorliegens einer freien Achse bei der Rotation des Zelleibes größer. Beim Rückwärtsschwimmen klappt der Geißelschwingungsraum in der bekannten Weise „regenschirmartig“ über das Hinterende zurück (BUDER 1915).

c) *Chromatium warmingii* Migula

ist 1874 von WARMING in Buchten der dänischen Küsten, in denen Tange faulten, gefunden und von COHN (1875) als *Monas warmingii* näher beschrieben und abgebildet worden:

„Sie ist in Gestalt der *Monas okenii* ähnlich, doch etwas robuster; ihr Körper ist wasserhell, von blaßrothem, dichtem Protoplasma gebildet und nur an den beiden abgerundeten Enden mit dunkelrothen Körnchen erfüllt; die Länge beträgt 15–20 Mikrom., die Breite 8 Mikrom.; doch kommen auch kleinere vor, ihre Bewegung ist taumelnd, doch viel lebhafter als die von *Monas okenii*; ... Eigenthümlich ist das Verhalten der Körnchen bei der Quertheilung; während in der

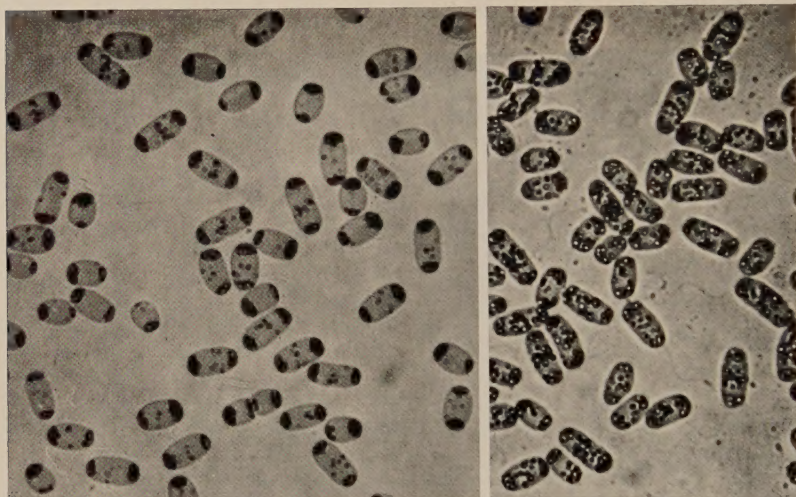


Abb.3. *Chromatium warmingii* (Migula), Stamm Ostrau aus Klärschlamm-Anreicherungskultur. Im rechten Bildteil sind die Geißeln sichtbar. Hellfeld-Lebendaufnahme; Gesamtvergr. 960mal

ungetheilten Monade die Mitte völlig körnerlos ist, bilden sich bei Beginn der Theilung von beiden Rändern her in der Mittellinie dunkle Körnchengruppen, welche in demselben Maße nach innen wachsen, als die Einfurchung selbst fortschreitet, so daß nach vollendeter Theilung jede Hälfte an ihren beiden Enden die charakteristischen Körnchenhaufen zeigt“ (COHN 1875).

Nach der Darstellung von COHN sind sowohl in der blaßroten Färbung als auch in der bipolaren Anordnung der Schwefelkugeln die charakteristischen Merkmale von *Chromatium warmingii* zu sehen, die es von *Chromatium okenii* unterscheiden. Die von ihm angegebenen Abmessungen beziehen sich wohl auf die größten der von ihm beobachteten Organismen, „doch kommen auch kleinere vor“.

Auf die von uns in Anreicherungskultur genommene Form (Abb.3) trifft die Beschreibung COHNS zu; lediglich die Größenverhältnisse weichen davon ab. Die Abmessungen der Zellen unseres Stammes betragen im Mittel $3,5-4,5 \times 5-10 \mu$; die Geißel ist $15-20 \mu$ lang. Nachdem bereits BEIJERINCK (1893) diese kleinere Form ($4 \times 10 \mu$) in den Händen hatte und sie seither mehrfach beschrieben worden ist (EWART 1897; BAVEN-

DAMM 1924), bestehen an der Identität unseres Organismus mit *Chromatium warmingii* keine Zweifel. BAVENDAMM (1924) benennt die kleine Form neu „*Chromatium warmingii* forma minus“, um sie gegen die von COHN beschriebene größere Form abzugrenzen.

d) Spektrale Absorptionskurven

Über die Pigmente der Schwefelpurpurbakterien, die wir in Anreicherungskultur gezogen haben, gewannen wir durch Aufnahme der spektralen Absorptionskurven an lebenden Zellen erste Anhaltspunkte. Außer den bereits genannten Arten (*Chromatium okenii*, *Chromatium warmingii* und *Thiospirillum jenense*), an deren Charakterisierung hauptsächlich gelegen war, bezogen wir noch einen Vertreter der kleinen Chromatien (*Chromatium vinosum*; Abb. 11) und eine unbewegliche Art (*Amoebobacter spec.*; Abb. 10) in die Untersuchung ein. Wir maßen die Absorption an Zellen, die zur Herabsetzung der Lichtstreuung zunächst durch 48 Std lange Belichtung in einer H₂S-freien, CO₂-haltigen Lösung (0,1% CaSO₄, 0,2% NaHCO₃, 0,1% Na-Ascorbinat, pH 6,6) von Schwefeltröpfchen befreit worden waren. Die Zellen wurden nach BARER (1955) in einer Eiweißlösung, deren Brechungskoeffizient dem der lebenden Zellen weitgehend ähnlich ist (30% Rinderserumalbumin) suspendiert. Wir lösten das Serumalbumin in 0,1% Na-Ascorbinat, um eine mögliche sekundäre Oxydation sauerstoffempfindlicher Pigmentkomponenten dieser streng anaeroben Zellen zu verhindern. Die Extinktion dieser Suspensionen wurde in 0,5 cm-Cuvetten im Beckman-Spektrophotometer (Modell DU) im Bereich von 340–1000 m μ in Intervallen von 5 m μ gemessen. Die gewonnenen Absorptionskurven (Abb. 4) weisen untereinander große Ähnlichkeit auf und lassen Rückschlüsse auf die vorhandenen Pigmente und ihre relativen mengenmäßigen Anteile zu.

Gemeinsam sind den Absorptionskurven die Maxima bei 375 und 590 m μ und ein oder mehrere Gipfel im nahen Infrarot. Diese Absorptionsmaxima entsprechen der Bakteriochlorophyllabsorption. Die Mehr Gipfligkeit kann auf die Absorption von drei verschiedenen Komponenten zurückgeführt werden, welche bei 800, 850 und 890 m μ maximal absorbieren.

Seit der Analyse des aus Purpurbakterien isolierten grünen Pigments (NOACK u. SCHNEIDER 1933) ist bekannt, daß die Bakteriochlorophylle aus *Rhodovibrio* (*Athiorhodaceae*) und einem Vertreter der kleinen *Thiorhodaceae* (Stamm Gaffron) miteinander identisch sind (FISCHER u. HASENKAMP 1935; FISCHER, LAMBRECHT u. MITTENZWEI 1938). Ein Vergleich der Infrarotabsorptionsspektren in vitro und in vivo hatte gezeigt, daß die an lebenden Zellen gemessenen Absorptionsmaxima bei 800, 850 und 890 m μ lediglich vom Bakteriochlorophyll herrühren (KATZ u. WASSINK 1939; WASSINK, KATZ u. DORRESTEIN 1939). Das Auftreten mehrerer („überzähliger“) Maxima im Infrarotgebiet wird auf das Vorliegen mehrerer

verschiedener Bakteriochlorophyll-Protein-Komplexe (WASSINK, KATZ u. DORRESTEIN 1939) oder verschiedenartiger mit Bakteriochlorophyll verbundener „Trägermoleküle“ zurückgeführt (DUYSENS 1952). In wäßrigen Extrakten zerriebener

Bakterien werden sowohl die Absorption als auch die Fluoreszenz der drei Absorptionstypen in verschiedenem Maße durch pH-Veränderungen beeinflusst (THOMAS, GOEDHEER u. KOMEN 1956a u. b). Die Gegenüberstellung der Absorptionskurven des Wildstammes und einer carotinoidfreien Mutante von *Rhodospseudomonas sphaeroides* führte darüber hinaus zu der Annahme, daß auf die Anzahl der Bakteriochlorophyll-Absorptionsbanden im nahen Infrarot auch Art und Menge der vorhandenen Carotinoide von Einfluß sind (GRIFFITH u. STANIER 1956; SISTROM, GRIFFITH u. STANIER 1956). Absorptionskurven von isolierten Chromatophoren aus *Chromatium* (Stamm D), das in Gegenwart von Diphenylamin gewachsen und sehr carotinoidarm war, lassen ebenfalls erkennen, daß eine Beziehung zwischen der Feinstruktur des Infrarotspektrums und dem Gehalt an Carotinoiden besteht (BERGERON u. FULLER 1959). Weitere dem Bakteriochlorophyll zugehörige Absorptionsbanden sind die bei 375 und 590 m μ ; nach bisherigen Beobachtungen ist ihre Lage weder von Art zu Art noch unter verschiedenen Kulturbedingungen Schwankungen unterworfen.

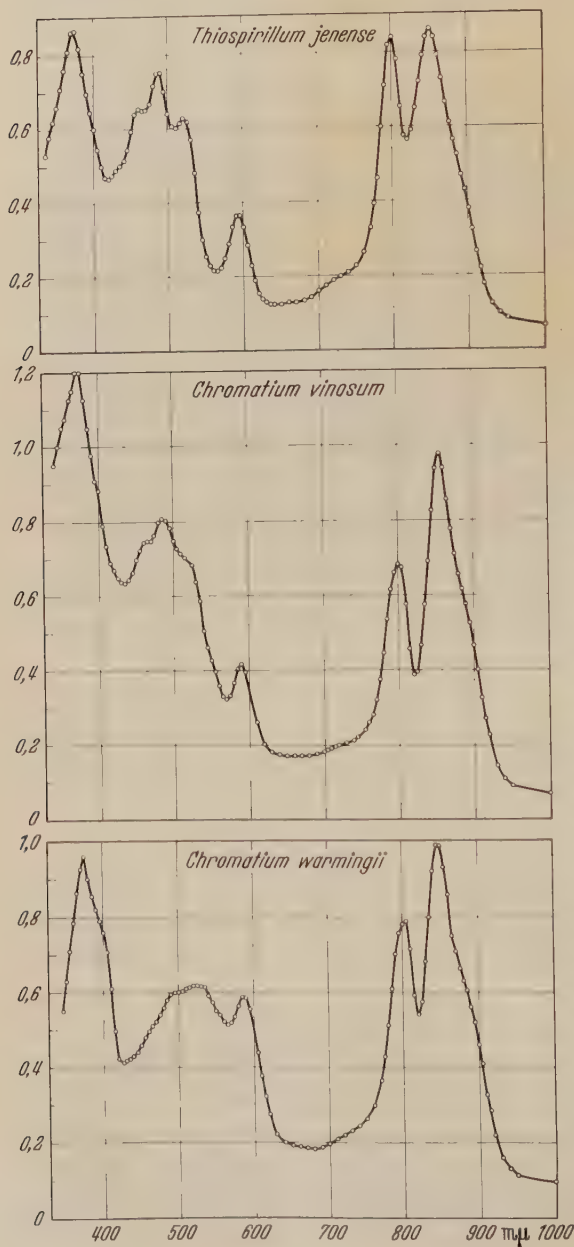


Abb. 4

Die Absorption im Bereich von 400–600 m μ ist auf den Gehalt an Carotinoidpigmenten zu-

rückzuführen; davon absorbieren die gesättigten und teilweise ungesättigten gelben Carotinoide im kürzerwelligen (400–520 $m\mu$) und die Hydroxy-, Oxo- und Methoxygruppen enthaltenden roten und purpurnen

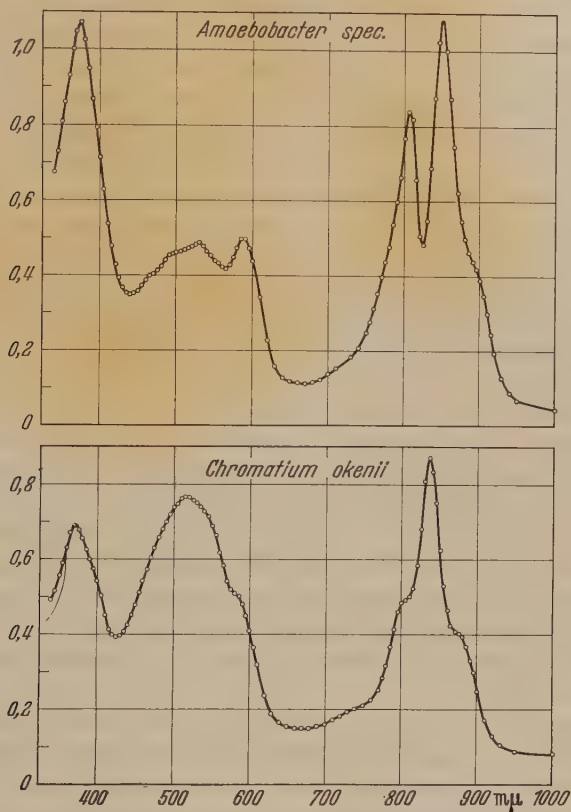


Abb. 4. Spektrale Absorptionskurven intakter Zellen von *Thiospirillum jenense*, Stamm Göttingen, *Chromatium vinosum*, *Chromatium warmingii*, *Amoebobacter spec.* und *Chromatium okenii*, Stamm Ostrau. — Gewaschene, schwefelfreie, lebende Zellen wurden in 30% Rinderserumalbumin + 0,1% Na-Ascorbinat suspendiert; die Extinktion wurde mit dem Beckman-Spektrophotometer, Modell DU von 340–1000 $m\mu$ in Intervallen von 5 μ gemessen (Näheres im Text S. 7)

Oxycarotinoide im längerwelligen Teil dieses Spektralbereichs. Für ein reines Carotinoidpigment ist eine dreigipflige Absorptionskurve kennzeichnend.

Daß die rote Pigmentkomponente der Purpurbakterien aus einem Gemisch von Carotinoiden besteht, ist seit MOLISCH (1907) mehrfach bestätigt worden; es sei hier nur auf die eingehende Darstellung von VAN NIEL (1944) verwiesen. Eine vollständige Analyse der Carotinoide von *Rhodospirillum rubrum* haben jüngst JENSEN u. Mitarb. (1958) angestellt. Untersuchungen, die dieser Studie an Vollständigkeit und Genauigkeit vergleichbar sind, liegen über die Carotinoide eines Schwefelpurpurbakteriums noch nicht vor. LEVY, TEISSIER u. WURMSER (1925) haben die

Absorptionsbanden der Carotinoide aus *Chromatium okenii* festgehalten, das zufällig in einem Wasserbehälter zur Massenentwicklung gelangt war.

Die Absorption der Carotinoidpigmente bestimmt zusammen mit dem Absorptionsgipfel des Bakteriochlorophylls bei 590 $m\mu$ die Farbe der Purpurbakterien, die — wie oben beschrieben — von Art zu Art zwischen gelbbraun, purpurrot und violett variiert. Eine gut ausgebildete dreigipflige Absorptionskurve (*Thiospirillum jenense* und *Chromatium vinosum*) deutet darauf hin, daß eine Carotinoid-Komponente im Überschuß gegenüber den anderen vorhanden ist. Ein breites Maximum (*Chromatium okenii* und *Chromatium warmingii*) zeigt an, daß ein Gemisch mehrerer Carotinoide in etwa den gleichen Mengenverhältnissen vorliegt. Ein hoher Gehalt an Oxycarotinoiden gibt sich durch die Verlagerung des Absorptionsschwerpunktes in den längerwelligen Bereich (550—600 $m\mu$) zu erkennen; dabei wird auch das Bakteriochlorophyll-Maximum bei 590 $m\mu$ mit angehoben (*Chromatium okenii* und *Chromatium warmingii*).

Die an Suspensionen lebender Zellen aufgenommenen spektralen Absorptionskurven lassen die Beziehungen zwischen Farbe und Pigmentgehalt gut erkennen. Die gelbbraune bis lachsfarbene Tönung der Suspensionen von *Thiospirillum jenense* wird hauptsächlich von Carotinoiden verursacht, von denen eines — mit Maxima bei 460, 488 und 520 $m\mu$ (in vivo) — in einem großen Überschuß vorhanden ist. Die lachsfarbenrötliche Tönung von *Chromatium vinosum* scheint auf ein und dasselbe Carotinoid zurückzugehen, das ebenfalls mengenmäßig überwiegt. Die weniger gute Ausprägung der Dreigipfligkeit, d.h. Maxima bei 465 und 488 $m\mu$ und eine Schulter bei 520 $m\mu$, sowie die Andeutung einer Schulter bei 550 $m\mu$ deuten darauf hin, daß daneben ein längerwellig absorbierendes Carotinoid in nicht unerheblicher Menge vorhanden ist. Letzteres ist für die gegenüber *Thiospirillum jenense* etwas mehr rötliche Farbe von *Chromatium vinosum* verantwortlich.

Bei *Chromatium warmingii* ist die Mehrgipfligkeit der typischen Carotinoidabsorptionskurve noch angedeutet. Das Maximum bei 522 $m\mu$ und die eben noch sichtbaren Schultern bei 470, 495 und 555 $m\mu$ lassen erkennen, daß mehrere Carotinoidpigmente in etwa gleichen Mengen nebeneinander vorliegen; daß zumindest eines davon ein Oxycarotinoid ist, kommt in der relativ starken Anhebung des Bakteriochlorophyll-Maximums bei 590 $m\mu$ zum Ausdruck. Im Vergleich zu *Thiospirillum jenense* und *Chromatium okenii* ist *Chromatium warmingii* als carotinoidarm zu bezeichnen: der violette Farbton von Suspensionen lebender Zellen wird durch die Oxycarotinoide und die Bakteriochlorophyllabsorption bei 590 $m\mu$ hervorgerufen.

Noch carotinoidärmer ist *Amoebobacter spec.* Mit schwach angedeuteten Schultern bei 470 und 495 $m\mu$ und einem Maximum bei 530 $m\mu$ ist die

spektrale Absorptionskurve der von *Chromatium warmingii* ähnlich. Durch die Absorption der Oxycarotinoide wird die Bakteriochlorophyllbande bei $590\text{ m}\mu$ ebenfalls angehoben.

Aus der Reihe der genannten Organismen ragt *Chromatium okenii* durch seinen im Verhältnis zum Bakteriochlorophyllgehalt hohen Gehalt an Carotinoiden hervor; das Absorptionsmaximum überragt hier den Bakteriochlorophyllgipfel bei $375\text{ m}\mu$. Das Fehlen jeder Andeutung eines Nebenmaximums oder von Schultern sowie die Lage des Maximums bei $515\text{ m}\mu$ sprechen dafür, daß hier ein relativ ausgeglichenes Gemisch von Carotinoiden und Oxycarotinoiden vorliegt; der einen blaugrünen Ton bewirkende Bakteriochlorophyllgehalt ist nur von geringem Einfluß auf den Farbton. Das klare Purpurrot von *Chromatium okenii* läßt sich somit aus der spektralen Absorptionskurve gut verstehen.

Auf weitere Beziehungen zwischen Pigmentgehalt und Farbe und die Analogien zu den roten und braunen schwefelfreien Purpurbakterien soll erst nach der Identifizierung und quantitativen Erfassung der Pigmente eingegangen werden.

II. Verbreitung der großen Schwefelpurpurbakterien und Bedingungen ihres Auftretens am Standort

Da wir die Hinweise für die Anreicherung der großen Schwefelpurpurbakterien, ihre Abtrennung von störenden Begleitorganismen und ihre Reinkultur vorwiegend ökologischen Beobachtungen verdanken, seien diese in gedrängter Form unter Würdigung der klassischen Arbeiten mitgeteilt.

Hinsichtlich der zahlreichen älteren Arbeiten sei auf die ausgezeichnete Monographie von BAVENDAMM (1924) verwiesen, der die bis dahin vorliegenden Einzelbeobachtungen zusammen mit eigenen Befunden und Deutungen übersichtlich dargestellt hat. Die Mehrzahl seiner Beobachtungen und Folgerungen sind mit unseren identisch.

Den natürlichen Standort, an dem Schwefelpurpurbakterien vorkommen und zu einer Massenentwicklung gelangen, insbesondere die Bedeutung des Schwefelwasserstoffs hat bereits WINOGRADSKY (1888) treffend geschildert:

„Sie sind überall in Sümpfen und Tümpeln verbreitet selbst da, wo man ihr Vorkommen nicht ahnt, weil sie nur in höchst unbedeutender Menge zugegen und durch direkte mikroskopische Untersuchung des Wassers oder Schlammes nicht zu entdecken sind. Eine namhafte Vermehrung erreichen sie nur in Gewässern, welche eine gewisse Menge Schwefelwasserstoff gelöst enthalten. Eine H_2S -Ausscheidung kann auch in jedem Sumpfe vor sich gehen, wo pflanzliche Überreste faulen; ... Sind in der Natur oder in einem Gefäße die Spezialbedingungen für das Leben der Schwefelbakterien geschaffen, so erscheinen sie, und zwar gewöhnlich nicht eine vereinzelte Form, sondern einige oder mehrere Formen zusammen“.

Das hat „seinen Grund darin, daß ihnen gleiche physiologische Eigenschaften zukommen, wenigstens in Betreff der Rolle, welche H_2S respektive S in ihren Lebensprozessen spielen“ (1888).

Die Bedeutung des zweiten Faktors, der neben Schwefelwasserstoff die Entwicklung von Schwefelpurpurbakterien bedingt, das Licht, blieb von WINOGRADSKY ursprünglich jedoch unerkannt. Obwohl schon ältere Autoren die fördernde Wirkung des Lichtes auf das Wachstum festgestellt hatten, hat erst ENGELMANN (1883, 1888) auf Grund seiner Untersuchungen über die phototaktischen Schwimmbewegungen seines „*Bacterium photometricum*“ die Vorstellung entwickelt, daß der Farbstoffkomplex der Purpurbakterien wie das Chlorophyll wirke und die Assimilation von CO_2 ermögliche.

Diese Erkenntnisse, daß sowohl Schwefelwasserstoff als auch Licht zum Gedeihen der Purpurbakterien notwendig sind, zu einer gut begründeten Theorie vereinigt zu haben, ist das Verdienst BUDERS (1919). Zu dem Schluß, daß bei den Schwefelpurpurbakterien „eine Photosynthese und Chemosynthese miteinander verquickt sind“, befähigten ihn auf Grund vorwiegend ökologischer Beobachtungen angestellte scharfsinnige Überlegungen.

Die farblosen Schwefelbakterien sind an außerordentlich spezifische Standortbedingungen angepaßt. Sie gedeihen bei geringer H_2S -Konzentration und mäßiger O_2 -Spannung, also an der Grenzschicht H_2S-O_2 . Da *Beggiatoa* die zur CO_2 -Assimilation und zum Wachstum benötigte Energie aus der Oxydation von Schwefelwasserstoff (chemolithotropher Stoffwechseltypus) bezieht, ist das Vorhandensein von Schwefelwasserstoff und Sauerstoff eine unbedingte Voraussetzung ihrer Existenz. Ihr Gedeihen ist also an eine Grenzschicht gebunden, wie sie beispielsweise an der Oberfläche eines Faulschlammes vorliegt, der von sauerstoffhaltigem Wasser überflossen wird.

Derart spezifische Ansprüche an den Standort bestehen bei den Schwefelpurpurbakterien nicht. Sie sind gegen Schwankungen im H_2S - und O_2 -Gehalt erheblich widerstandsfähiger als die farblosen Formen und halten es eine Zeitlang sowohl in H_2S -gesättigtem als auch belüftetem Wasser aus. „Wären die roten Schwefelbakterien nun wie die farblosen nur auf die Chemosynthese angewiesen, so könnten sie diese oft genug aus O_2 -Mangel überhaupt nicht realisieren. Hier zeigt sich nun die Überlegenheit der Photosynthese, die ihnen eine Zerlegung der Kohlensäure auch dann ermöglicht, wenn kein freier Sauerstoff zur Verfügung steht. So würde also der Vorteil, den die roten vor den farblosen Schwefelbakterien durch den Besitz der Pigmente voraus haben, darin bestehen, daß ihnen die Photosynthese die Möglichkeit gewährt, sich auch solche Regionen zu erobern, die den farblosen verschlossen sind“ (BUDER 1919).

Der Stoffwechsel der Schwefelpurpurbakterien ist also in erster Linie ein photosynthetischer. Sie benötigen H_2S lediglich als zusätzlichen H-Donator, da sie nicht wie die grünen Pflanzen O_2 entwickeln können, sich also des bei der CO_2 -Reduktion zwangsläufig auftretenden Elektronendefizits nicht durch O_2 -Abscheidung entledigen können. Die *Thiorhodaceae* benötigen zu ihrer Entwicklung unter allen Umständen Licht.

Für die Ausarbeitung einer möglichst spezifischen Methode zur Anreicherung der *Thiorhodaceae* unter Ausschluß anderer Organismen, die an den von WINOGRADSKY geschilderten Standorten ebenfalls vorkommen, war uns eine andere Beobachtung BUDERS (1919), bzw. eine Kombination von Beobachtungen, von größtem Wert. Sie betreffen die Lichtfarbe oder die die Entwicklung der Schwefelpurpurbakterien fördernden spektralen Anteile des Sonnenlichts.

Bei der Untersuchung der Lichtreizbarkeit von Chromatien und Thiospirillen fiel BUDER auf, daß zwischen der Lage der Ansammlungen von Purpurbakterien im Mikrospektrum und dem Absorptionsspektrum des Chlorophyll eine Beziehung besteht: Die Bakterienansammlungen liegen gerade zwischen den Absorptionsbändern des Chlorophylls; die Purpurbakterien häufen sich also gerade an den Stellen des Spektrums an, für die das Chlorophyll relativ durchlässig ist.

„Es scheinen demnach für unsere Schizomyceten gerade jene Strahlen von besonderer physiologischer Bedeutung zu sein, die beim Durchgang durch die Chloroplasten am wenigsten geschwächt werden“ (BUDER 1919).

Weiterhin beobachtete er, daß die Schwefelpurpurbakterien in Tümpeln zur Entwicklung gelangten, die mit einer dichten Decke von *Lemna* bedeckt waren. Ihnen mußte also der Lichtanteil genügen, welcher durch das Chlorophyllfilter hindurch den Boden des Gewässers erreichte.

Das komplementäre Verhalten der Absorptionsspektren von Purpurbakterien und grünen Pflanzen eröffnet zusätzliche Möglichkeiten, *Thiorhodaceae* unter Ausschluß von Grün- und Blaualgen anzureichern. Die Unterschiede im Absorptionsspektrum von Grünalgen und Purpurbakterien sind am größten im nahen Infrarot; während die grünen Pflanzen dort nahezu keine Absorption aufweisen, liegt bei den *Thiorhodaceae* im Infrarot ein Maximum ihrer Absorption. Es liegt nahe, diesen Spektralbereich in Rohkulturen zur selektiven Förderung der *Thiorhodaceae* auszunutzen und durch Verwendung äußerst selektiver Filter auch die grünen Bakterien zu unterdrücken.

Die Herkunft des untersuchten Materials

Unser Material stammt aus den Teichen des Schloßparkes Ostrau bei Halle¹, in denen die uns interessierenden *Thiorhodaceae* mit großer Regelmäßigkeit und artenmäßig zeitlich gestaffelt auftreten. Diese Teiche geben das Bild von polysaprobien Tümpeln. An ihren Ufern stehen Taxodien, Erlen, Linden und Eichen. Ihre Oberfläche ist gewöhnlich von einer dichten Decke von *Lemna* bedeckt. Die Wassertiefe beträgt im Durchschnitt 20 cm. Der Bodenschlamm wird vor allem von den gebleichten Resten der abgesunkenen Lemmen gebildet, daneben aber auch von halbzerfallenen Laubblättern, Zweigstücken und dergleichen. Die Teiche stellen

¹ Es ist derselbe Standort, von dem die Organismen bereits früher für reizphysiologische Untersuchungen entnommen wurden (SCHLEGEL 1950, 1956). Für die neuerliche Entnahme am Standort und Überlassung reichlichen Materials danken wir Herrn E. OHMANN.

ein wahres Dorado der Schwefelpurpurbakterien dar. So finden sich in diesem Faulschlamm zu jeder Jahreszeit Formen von *Thiospirillum jenense*, *Chromatium okenii*, *weissei*, *warmingii*, *vinosum* u.a. Eine Massenentwicklung tritt nach den sich über drei Vegetationsperioden erstreckenden Beobachtungen regelmäßig in der Zeit von Ende April bis Ende Juli auf. Die sonst schwarze Schlammoberfläche ist dann weinrot oder lachsfarben gefärbt, und zu gewissen Zeiten verbreiten sich die Bakterien bis zu 5 cm Höhe über den Schlammhorizont. Während dieses günstigen Entwicklungsstadiums ist die Entnahme von Material mittels eines Schöpfers oder durch Pipettieren mit Hilfe einer großen Vorratsflasche äußerst einfach.

Die Standortbeobachtungen während mehrerer Vegetationsperioden ließen eine eigentümliche Sukzession im Auftreten von *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* erkennen. Während im Mai *Chromatium okenii* in regster Entfaltung anzutreffen und durch seine purpurfarbenen Überzüge und Bakterienwolken schon weithin sichtbar ist, verschiebt sich Anfang Juni das Verhältnis zugunsten der Thiospirillen, bis von Mitte Juni ab die intensiv lachsfarbenen Ansammlungen das Vorherrschen und später alleinige Vorkommen dieser Art anzeigen. Selbst an anderen Stellen, wo wegen größerer Wassertiefe (40–50 cm) die Massenentwicklung erst später (Juni–Juli) einsetzte, war die geschilderte Sukzession unverkennbar.

Die Entwicklung war besonders üppig und die Überzüge und Wolken von *Thiorhodaceae* waren besonders rein an den Stellen, an denen das Gewässer von einer geschlossenen *Lemna*-Decke überzogen war. Es handelt sich hier um dieselbe Beobachtung, die bereits BUDER (1919) zur Entdeckung der Komplementarität der Absorptionsspektren von grünen Pflanzen und Purpurbakterien und ihrer ökologischen Bedeutung geführt hatte. Bringt man am Standort gesammelten Faulschlamm und Bakteriensuspensionen enthaltendes Material im Laboratorium in Standzylinder, und überläßt die Rohkultur einige Tage dem Licht (eines Nordfensters) ausgesetzt sich selbst, so läßt sich unschwer feststellen, ob das Material von einer lemnafreien oder einer von *Lemna* überzogenen Stelle stammt. Während letzteres von grünen Organismen und Blaualgen über mehrere Tage nahezu frei bleibt, werden die Standzylinder, die mit Material von offenen Wasserstellen beschickt wurden, rasch von Oscillarien und Grünalgen überzogen und erfüllt. Das deutet darauf hin, daß bereits unter den natürlichen Bedingungen am Standort im Licht, das ein Chlorophyllfilter passiert hat, eine Selektion zugunsten der *Thiorhodaceae* stattgefunden hat, ein Umstand, den man sich bei der Anreicherungskultur zunutze macht.

Über die Ursache der Formationsfolge, also der zeitlichen Nacheinanderfolge im Auftreten von *Chromatium okenii* und *Thiospirillum*, die

am Standort ebenso wie in der Rohkultur im Standzylinder mit der gleichen Regelmäßigkeit zu beobachten war, lassen sich vorläufig nur Vermutungen anstellen. In erster Linie scheint es sich um eine Frage der H_2S -Konzentration zu handeln. Am Standort scheint die H_2S -Entwicklung zu Beginn der warmen Jahreszeit besonders hoch zu sein. Dieser erste H_2S -Stoß wird von einer besonders üppigen Entwicklung von *Chromatium okenii* begleitet. Mit Nachlassen der H_2S -Produktion treten an der gleichen Stelle mehr und mehr Thiospirillen auf, bis sie im Hochsommer schließlich überwiegen und die vorherrschende Bakterienflora bilden.

Den gleichen Schluß auf das artenmäßig verschiedene Verhalten der H_2S -Konzentration gegenüber lassen Beobachtungen an Standzylindern zu, auf deren Grund sich neben Schlamm Schwefelleber und Gips befand. Wurden derart vorbereitete Gefäße mit Standortwasser überschichtet, das beide Arten enthielt, so war bereits nach etwa 24 Std eine nahezu vollständige Sonderung eingetreten. Während sich die Chromatien an der Oberfläche der Schlammschicht ansammelten und durch den Schlamm zu Gips und Schwefelleber vordrangen, also die Orte höherer H_2S -Konzentration aufsuchten, blieben die Thiospirillen im Mittel 3 Tage schwärmend, erfüllten die ganze Wassersäule oder bildeten mehrere Zentimeter über dem Schlammhorizont eine Bakterienplatte. Ebenso ordneten sich beide Arten in Reagensgläsern an, in die ein Bakterien-gemisch einpipettiert wurde.

Die geschilderte Formationsfolge kommt auch in dem System von KOLKOWITZ u. MARSSON (1908) zum Ausdruck; sie führen unter den Polysaprobien *Chromatium okenii*, *vinosum* und *minutissimum* an, unter den α -Mesosaprobien von den beweglichen *Thiorhodaceae* nur *Chromatium okenii* und Thiospirillen. Das gleiche Verhältnis macht BAVENDAMM (1924) geltend. „Die Thiospirillen scheinen z. B. reineres Wasser zu beanspruchen und werden wohl nur selten in der polysaprobien Zone vorkommen.“

Zur Erklärung der Formationsfolge sind wahrscheinlich noch weitere Faktoren zu berücksichtigen. Den auf Beobachtungen beruhenden Vermutungen wird durch eine ins einzelne gehende Analyse der Ernährungsbedingungen nachzugehen sein.

III. Beobachtungen an Roh- und Anreicherungskulturen

a) Ältere Bemühungen um die Anreicherungskultur

1. Die Rohkultur Winogradsky's

Die Schwefelpurpurbakterien im Laboratorium zu kultivieren, wurde erstmalig von WINOGRADSKY (1888) versucht. „Ich verfuhr gewöhnlich auf die Weise, daß ich einige zerschnittene Stücke eines frisch geschnittenen *Butomus*-Rhizoms mit dem an demselben anhaftenden Schlamm in ein tiefes, 3—5 l fassendes Gefäß legte und ein paar Gramm

Gips zusetzte. Nach 5—7 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur beginnt die H_2S -Entwicklung ...“ (Abb. 5a). WINOGRADSKY erhielt so am häufigsten *Beggiatoa*, nur selten *Chromatium okenii* und *vinosum*.

Das Verfahren WINOGRADSKYS, Schwefelpurpurbakterien im Laboratorium zu kultivieren oder wenigstens eine Zeitlang lebend zu erhalten, ist eher als „Rohkultur“ zu bezeichnen. In den Winogradskyschen Standzylindern lassen sich nach unseren Erfahrungen vom Standort entnommene Chromatien und Thiospirillen 6—12 Wochen am Leben erhalten; zuweilen kommt es auch zu einer raschen Vermehrung der Organismen; um eine verlässliche Methode, zu jeder Jahreszeit schwärmendes Material im Laboratorium heranziehen zu können, handelt es sich dabei jedoch nicht. Rückblickend ist festzustellen, daß der vom Standort entnommene Faulschlamm bereits zu stark in Zersetzung begriffen und arm an organischem Material ist, so daß die Sulfatreduktion bald erlischt.

Die Bedingungen in den nach WINOGRADSKY angesetzten Standkulturen sind den natürlichen Standortverhältnissen außerordentlich ähnlich. Sie gleichen ihnen hinsichtlich der selektiven Förderung der Entwicklung der großen *Thiorhodaceae* sogar vollkommen. Wenn es in ihnen einmal zum Wachstum von *Thiorhodaceae* kommt, so handelt es sich immer um *Chromatium okenii* oder *Thiospirillum jenense*, niemals um die kleineren Formen vom Typ des *Chromatium vinosum* oder *Chromatium minutissimum*. Die Entwicklung der verschiedenen Arten der *Thiorhodaceae* beruht demnach nicht nur auf dem Vorhandensein von H_2S und Licht; feinere Unterschiede in den Milieubedingungen treffen eine Auswahl zwischen den Arten.

Lange Zeit wurden hinsichtlich der Erforschung der Kulturbedingungen der *Thiorhodaceae* keine Fortschritte gemacht: „eine Methode aber, sich Purpurbakterien zu jeder Zeit mit Sicherheit in großen Mengen im Laboratorium zu verschaffen, fehlte bisher“ (MOLISCH 1907). MOLISCHS Empfehlungen, zur Anreicherung von Purpurbakterien organische Substanzen faulen zu lassen, zielten lediglich auf die Kultur der *Athiorhodaceae* ab.

2. Die Anreicherungskultur Buders

Eine sichere Methode zur selektiven Anreicherung einer einzigen Art unter den Schwefelpurpurbakterien aus einer geringen Menge Impfmateriel hat erst BUDER entwickelt. Nach seinem Verfahren läßt sich beinahe aus jedem Schlammwasser und aus vielen Erdproben ein kleines *Chromatium* ziehen, bei dem es sich meist um *Chromatium vinosum* handelt.

Nach dem von SCHRAMMECK (1934) beschriebenen Verfahren werden die Kulturgläser mit Eiweiß, Erde, Schwefelleber und Gips beschickt und schließlich mit Sand abgedeckt (Abb. 5b). Dabei genügt ein halbes

Gramm *albumen ex ovis* (für einen Standzylinder von etwa 500 ml Rauminhalt); der Gips dient nicht nur als Sulfatquelle, sondern gleichzeitig dazu, das Zerfließen der Schwefelleber und die Diffusion des Schwefelwasserstoffs herabzusetzen; die Erde liefert Nährsalze und Spurenelemente und wird durch eine Sandschicht bedeckt, die ein Aufwirbeln verhindern soll. Werden derart vorbereitete Standzylinder mit einem Gemisch von Schwefelpurpurbakterien geimpft, mit Regenwasser aufgefüllt und 3—4 Tage bei 30° C im Lichtkasten inkubiert und später am Nordfenster dem Tageslicht ausgesetzt, so kommt es zu einer selektiven Wachstumsförderung von *Chromatium vinosum*; nach 14tägiger Kulturdauer erfüllt es in Schleiern und Wolken den Standzylinder. Nach den bisherigen Erfahrungen sind keine anderen *Thiorhodaceae* nach diesem Verfahren zur Entwicklung gekommen. Enthält das Impfmateriel jedoch *Athiorhodaceae*, so ist es leicht möglich, daß die Chromatien durch diese überwachsen werden; durch Weglassung des Eiweißzusatzes lassen sich die schwefelfreien Purpurbakterien unterdrücken. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist unter den genannten Bedingungen so groß, daß keine Grün- oder Blaualgen aufkommen können bzw. durch mehrfache Überimpfungen rasch abgestreift werden können.

Die großen Chromatien und Thiospirillen lassen sich nach dieser Methode nicht anreichern. Selbst bei Impfungen mit einem Überschuß von *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* setzten sich stets die kleinen Chromatien durch.

Thiospirillum jenense vorübergehend in Kultur zu nehmen, ist BUDER (1915) nach der Methode WINOGRADSKYS gelungen:

„Eine weithalsige Pulverflasche von $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ l Inhalt wird etwa zur Hälfte mit zerkleinerten Rhizomen, Gips und dem vom natürlichen Standort mitgebrachten Schlick beschickt und mit Wasser überschichtet, wobei man dafür zu sorgen hat, daß die Pflanzenteile nicht nach oben geschwemmt werden. Das Gefäß fest zu verschließen ist unnötig. Hat nach etwa einer Woche die lebhaft entwickelte schwärmenden Formen begonnen, so versenkt man die ganze nun bis zum Überlaufen gefüllte Flasche in einen geräumigen Standzylinder, der einige Liter fassen kann und füllt diesen so weit, daß der Wasserspiegel 10—20 cm über der Mündung der Flasche liegt. Die Zylinderöffnung wird mit einer Glasplatte bedeckt und das Ganze an ein Nordfenster gestellt. Hiermit wird der Fehler vermieden, der gewöhnlich bei der Herstellung ähnlicher Kulturen begangen wird: daß die zur Verfügung stehende Wassermenge von vornherein zu klein ist und durch die abgeschiedenen Stoffwechselprodukte die ursprünglich recht üppige Entwicklung bald unterbunden und das Vorhandensein gut schwärmender, lebenskräftiger Exemplare in einigen Wochen unmöglich gemacht wird. Bei der geschilderten Anordnung liefert die verrottende Vegetabilienmasse und die Zersetzung des Gipses von unten her H₂S und die sonstigen Nährstoffe, während von oben her reines, sauerstoffhaltiges Wasser zur Verfügung steht. An der Grenze, also an der Flaschenmündung, versammeln sich nun Chromatien, Thiospirillen und andere Schwefelbakterien in dichten Scharen und füllen den Flaschenhals mit einer zarten roten Wolke, die sich Monate hindurch halten kann ... Eine bestimmte Anreicherungs-methode, die

es nun erlaubte, aus einem nur wenige Thiospirillen enthaltenden Schlick stets größere Massen möglichst reinen Materials zu erhalten, habe ich allerdings nicht ausgearbeitet“ (BUDER 1915).

3. Die Anreicherungskultur Bavendamm's

Um für Isolierungs- und Reinkulturversuche zu jeder Zeit im Laboratorium Schwefelpurpurbakterien in ausreichenden Mengen vorrätig zu haben, machte BAVENDAMM (1924) den Versuch, die von WINOGRADSKY eingeführte Methode der Anreicherungskultur zu modifizieren und zu verbessern. Von der Vorstellung ausgehend, daß die Konzentration der gelösten Sulfate bei der Desulfurikation im Schlamm einen Minimumfaktor darstellen könnte, ersetzte er zunächst einen Teil des schwer löslichen Gipses durch Magnesiumsulfat und setzte zur Säurebindung Calciumcarbonat zu.

Ein weitergestecktes Ziel von BAVENDAMM'S Bestrebungen war die Ausarbeitung von Verfahren zur selektiven Anreicherung einzelner Arten von Schwefelpurpurbakterien; und es unterliegt keinem Zweifel, daß er wie alle Forscher, die sich um die Laboratoriumskultur von Schwefelpurpurbakterien bemühten, das an den natürlichen Standorten so häufig auftretende *Chromatium okenii* anzureichern bestrebt war. Soweit sich seinen Darstellungen entnehmen läßt, ist es ihm auch gelungen, durch geeignete Wahl des Ausgangsmaterials nicht oder wenig bewegliche Arten von stark beweglichen getrennt anzureichern; in Rohkulturen mit einem Überschuß an *Characeae* und wenig Schlamm entwickelte sich vorzugsweise *Lamprocystis*, mit viel Schlamm und wenig Blattmaterial herrschten Chromatien vor. Eine weitergehende Auftrennung oder gar Anreicherung der großen Formen mißlang jedoch.

Einige wichtige richtungweisende Beobachtungen BAVENDAMM'S bei dem Versuch, *Lamprocystis roseo-persicina* und *Chromatium warmingii* (forma minus) in absolute Reinkultur (im bakteriologischen Sinne) zu bringen, können hier nicht unerwähnt bleiben. Neben einer Reihe nährsalzreicher Nährlösungen benutzte BAVENDAMM auch die von LIESKE (1911) für die Kultur von Eisenbakterien angewendete Nährlösung und ergänzte sie lediglich durch den Zusatz von Kalk: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 g; KCl 0,005 g; MgSO_4 0,005 g; K_2HPO_4 0,005 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,001 g; CaCO_3 1,0 g; aqua dest. 100,0 ml.

Daß gerade mit dieser relativ nährsalzarmen Nährlösung sowohl mit *Lamprocystis* als auch mit *Chromatium* die besten Erfahrungen gemacht wurden, ist hier besonders zu betonen, da die Konzentration der Nährsalze für den Erfolg der Reinkultur und zur Erhaltung im schwärmenden Zustand von entscheidender Bedeutung zu sein scheint.

So gelang es sogar, *Chromatium warmingii* in Lieskescher Nährlösung zum Wachstum im schwärmenden Zustand zu bringen. „Nach kurzer Zeit war fast die ganze Flasche oder das Reagensglas von dichten, weinroten Wolken erfüllt,“ ... (BAVENDAMM 1924). Weiter wird berichtet, „daß ... ein kurzer Versuch, *Chromatium okenii* rein zu züchten, nicht geglückt ist. Ein Teil der Chromatien hielt sich zwar lange Zeit (sogar

mehrere Monate) in der Lieskeschen Nährlösung lebend, aber eine Isolierung war nicht möglich, da keine Wolkenbildung wie bei *Chromatium warmingii* eintrat. Nur einmal konnte eine solche Wolke beobachtet werden, als wahrscheinlich einige mir unbekannte günstige Faktoren zusammengetroffen waren. Die Hauptmasse der Chromatien bildete immer nur eine ziemlich feste rote Haut auf dem Boden des Gefäßes.“ Daß BAVENDAMM bereits den möglichen, wenn auch mühsamen, Pfad zum Erfolg der Kultur von *Chromatium okenii* sah, geht aus seiner abschließenden Bemerkung hervor: „Bei einer längeren Beschäftigung mit dieser anscheinend empfindlicheren Art, die nicht in meiner Absicht lag, wird man aber auch hier zu einem positiven Ergebnis kommen.“

Bemerkenswert scheint uns „auch die Beobachtung, daß Thiospirillen, die mit den Chromatien teilweise in die Nährlösung hineingekommen waren, meist schon am nächsten Tage bewegungslos, vermutlich tot, in der Flüssigkeit gefunden wurden“.

Von vielleicht geringerer Bedeutung ist die Tatsache, daß BAVENDAMM sowohl seinen Anreicherungskulturen als auch den Kulturen in synthetischer Nährlösung den nötigen Schwefelwasserstoff in Gasform verabreichte, indem er — wie schon KEIL (1912) und SKENE (1914) verfahren — die Kulturgläser anaerob in einem geschlossenen Gefäß (Anaerobenglocken, -töpfe, Exsiccatoren) mit einem bestimmten Partialdruck an H_2S inkubierte (BAVENDAMM 1934). Das zugesetzte $CaCO_3$ wirkte als neutralisierendes Agens sowohl für H_2S als auch insbesondere für dessen Oxydationsprodukt Schwefelsäure. BAVENDAMM hat die H^+ -Ionenkonzentration weder gemessen noch ihre Bedeutung für die Kultur der Purpurbakterien diskutiert.

4. Die Anreicherungs- und Reinkultur van Niels

Die umfassendste und intensivste Untersuchung über die schwefelhaltigen Purpurbakterien in Laboratoriumskultur hat VAN NIEL (1932) angestellt. Er hielt sich von vornherein an die Prinzipien der „Beijerinckschen Stöpselflaschenmethode“, die BEIJERINCK gelegentlich seiner Untersuchung über Atmungsfiguren bereits selbst zur Erhaltung von *Chromatium warmingii* und *Chromatium okenii* erprobt hatte (BEIJERINCK 1893). Er impfte eine vorgegebene synthetische Nährlösung mit einem Gemisch von Bakterien, das er aus Rohkulturen oder vom natürlichen Standort entnahm. Durch Variation der Zusammensetzung des mineralischen Nährmediums gestaltete er verschiedene Milieubedingungen, unter denen sich der eine oder andere Organismus durchsetzte. Die durch die Selektionsbedingungen begünstigte Form brachte er dann in Reinkultur, studierte ihre Morphologie und Physiologie unter verschiedenen Kulturbedingungen und stellte daran auch seine für die vergleichende Biochemie der Photosynthese außerordentlich entscheidenden Untersuchungen an (VAN NIEL 1932, 1936).

VAN NIELS Untersuchungen und Vorgehensweise stellte nun in mehrfacher Hinsicht einen gegenüber den Bemühungen seiner Vorgänger grundlegenden Fortschritt dar. An Stelle von Schwefelwasserstoff

verwendete VAN NIEL $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ und beugte damit der Ansäuerung der Nährmedien durch Schwefelsäurebildung vor. Die Verwendung von Glasstöpselflaschen als Kulturgefäße machte das Verfahren einfacher als jede andere zuvor angewandte Methode. Von der Erkenntnis ausgehend, daß das Gleichgewicht zwischen Natriumsulfid, seinen Hydrolyseprodukten und dessen Dissoziationsprodukten von der H^+ -Ionenkonzentration entscheidend beeinflußt wird, erkannte er der Einstellung und Kontrolle des pH -Wertes eine angemessene Bedeutung zu.

Das von VAN NIEL benutzte Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung: NH_4Cl 0,1 g; K_2HPO_4 0,1 (–0,05) g; MgCl_2 0,1 (–0,02) g; NaCl 2,0 g; NaHCO_3 0,5 g; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 (–0,3) g; dest. Wasser 100,0 ml.

Diese Nährlösung wurde mit wenig aus Rohkulturen entnommenem Material geimpft. Die Stöpselflaschen wurden luftblasenfrei verschlossen. An einem Nordfenster aufgestellt war nach 2–3 Wochen das erste sichtbare Wachstum nachzuweisen und nach 4–6 Wochen hatten sich die Kulturen gut entwickelt; am schnellsten wuchsen die Kulturen bei pH 8,0–8,5. Durch mehrfache Überimpfungen ließen sich Kulturen heranziehen, die mikroskopisch beinahe rein erschienen. Durch kontinuierliche Belichtung in einem Lichtkabinett bei 25–30° C ließ sich die Geschwindigkeit der Entwicklung auf das fünf- bis sechsfache steigern. Anreicherungen nach der beschriebenen Methode führten mit großer Sicherheit zum Ziel, jedoch ausnahmslos zur Selektion eines kleinen *Chromatium*, das BAVENDAMMS Beschreibung von *Chromatium warmingii* forma minus Bav. entspricht.

„This result was obtained regardless of the composition of the inoculum. The latter might consist almost exclusively of *Chromatium okenii*, or of any of the other forms—and in a number of cultures care was taken to inoculate with as nearly pure material as was possible—yet after a few transfers the culture invariably showed an abundance of the small *Chromatium*, and the other species appeared to be rapidly overgrown“ (VAN NIEL 1932).

Angesichts der Tatsache, daß in Rohkulturen nach WINOGRADSKY die großen Formen unter den Schwefelpurpurbakterien wie *Chromatium okenii* öfter und reichlicher auftreten, wurde versucht, durch Zusätze zu der Nährlösung und Veränderung der H_2S -Konzentration Verhältnisse zu schaffen, unter denen die großen Formen begünstigt wurden. Jedoch führten weder der Zusatz organischer Substanzen (zu je 0,1%) noch die Veränderung der H_2S -Konzentration oder des pH (zwischen pH 6,0 und 10,0 in Intervallen von 0,5 pH -Einheiten) bei 0,1% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ zu einer Anreicherung der großen Formen. Bei pH -Werten unter 7,5 fand innerhalb von 2 Wochen überhaupt keine Entwicklung statt.

An Objektträgerkulturen, die WINOGRADSKYS klassischem Verfahren entsprachen, konnte VAN NIEL beobachten, daß ein „ziemlich großes *Chromatium*“ selbst bei pH -Werten bis 6,5 gut beweglich und mehrere Tage am Leben blieb. „The best development seemingly took place at pH 7,0“ (VAN NIEL 1932). Es ist zu bemerken, daß diese einer Rohkultur entstammende Probe nicht mit der oben genannten Nährlösung, sondern mit einem Tropfen „ziemlich dünner Pufferlösungen“, denen Na_2S zugesetzt worden war, vermischt wurden. Die Beobachtung, daß ein niedriger pH -Wert als pH 7,0 den großen Formen noch zuträglich war, wurde also nicht in der Nährlösung der Anreicherungskulturen, sondern in erheblich weniger konzentrierten Lösungen angestellt.

Obwohl daraus gefolgert wurde, „that the p_H of the solution is not an independent factor determining whether or not growth would occur, but that it was closely connected with the composition of the medium, especially with the sulphide concentration“, wurden lediglich der p_H -Wert, die Na_2S - und die $NaHCO_3$ -Konzentration variiert. Ein Verfahren, nach dem die in der freien Natur weitverbreiteten großen Schwefelpurpurbakterien in synthetischen Nährlösungen zur Anreicherung gebracht werden können, hat sich jedoch nicht entwickeln lassen.

Die von VAN NIEL in Anlehnung an die „Beijerincksche Stöpsel flaschenmethode“ ausgearbeitete Methode zur Anreicherung und Kultur kleiner Schwefelpurpurbakterien wurde in der Folgezeit bei leichter Variation des Nährmediums mehrfach mit dem Ziele der Anreicherung und Isolierung angewendet.

H. GAFFRON (1934) kultivierte nach diesem Verfahren ein kleineres stark bewegliches *Thiocystis* ähnliches Schwefelpurpurbakterium, erzielte jedoch keine Reinkultur. Aus dieser Kultur brachte ROELOFSEN (1934, 1935) den Stamm in Reinkultur, der unter der Bezeichnung *Chromatium* Stamm D in alle Welt gegangen ist. Man kann ohne Übertreibung sagen, daß alle entscheidenden Aussagen über den Stoffwechsel der Schwefelpurpurbakterien auf Untersuchungen an diesem Stamm beruhen.

WASSINK u. MANTEN (1942) suchten in engster Anlehnung an die von VAN NIEL ausgearbeitete Methode einen Stamm zu isolieren, der nicht durch organische Substanzen begünstigt wurde. Aus dem Befund, daß alle isolierten Stämme mit Äpfelsäure besser wuchsen als in rein anorganischen Nährlösungen, ziehen die Autoren verallgemeinernd den Schluß, daß sich die Schwefelpurpurbakterien — wenigstens die aus gewöhnlichem Schlamm isolierten — unter photoheterotrophen Bedingungen besser entwickeln als unter photoautotrophen. Ein Vertreter der großen Chromatien wurde von ihnen nicht erfaßt.

Nach derselben Methode verfahrend und dieselbe Nährlösung benutzend, wie VAN NIEL, jedoch unter Weglassung des Kochsalzzusatzes, beobachtete MANTEN (1942) die Anreicherung eines großen Chromatiums ($8-12\mu$ lang), das er als *Chromatium okenii* beschrieb. Nach Überimpfung in frische Nährlösung der gleichen Zusammensetzung traten Zellen von nur $3-4\mu$ Länge auf. Zur möglichst raschen Isolierung wurden Agarröhrchen mit einer Verdünnungsreihe beimpft; da jedoch bei zweimaliger Überimpfung noch keine reinen Kolonien zu isolieren waren, wurde für weitere Verdünnungsreihen ein 0,2% Äpfelsäure und 0,1% Thiosulfat (an Stelle von $NaHCO_3$ und Na_2S) enthaltender Agar benutzt. Nach mehreren Übertragungen wurde das große Chromatium schließlich in Reinkultur erhalten. In Nährlösung erschienen die Organismen jedoch durchaus nicht einheitlich; die Zelllängen schwankten zwischen 1 und 15μ . Die Zellen waren nur wenig beweglich und „altogether they did not appear very healthy“. Zur Verbesserung der Kulturbedingungen wurde die Na_2S und $NaHCO_3$ enthaltende Nährlösung mit verschiedenen Mengen von Äpfelsäure und Thiosulfat ergänzt und bei p_H 7,0 inkubiert. Die nach 30 Tagen vorgenommene Auswertung ergab, daß mit 0,4% Thiosulfat und 0,05 und 0,1% Na-malat Zellen gewachsen waren, die etwa 8μ lang und $3,5\mu$ dick waren; nahezu die Hälfte aller Zellen war beweglich. Ohne die Problemstellung experimentell weiter zu verfolgen, kommt der Verfasser zu der Feststellung: „It is, therefore, evident that *Chromatium okenii* is a highly pleomorphic species ...“; einer klaren Stellungnahme zur Frage der Pleomorphie bei der Gattung *Chromatium* muß sich der Verfasser jedoch enthalten.

Aus allen erörterten Untersuchungen, die bisher veröffentlicht worden sind, geht hervor, daß es bisher noch nicht gelungen ist, eine der großen Formen der *Thiorhodaceae* in Anreicherungskultur oder gar Reinkultur zu bringen. Alle diesbezüglichen Arbeiten berichten günstigstenfalls von Bedingungen, unter denen eine der großen Formen beobachtet oder über einen begrenzten Zeitraum am Leben erhalten wurde.

*b) Eigene Anreicherungsversuche
in Klärschlamm-Anreicherungskulturen*

1. Vergleich verschiedener Schlammgemische

Die uns von dem Standort Ostrau bei Halle/Saale (vgl. S. 13) übersandte Wasserprobe enthielt schwefeltröpfchenreiche, schwärmende Zellen von *Chromatium okenii*, *Thiospirillum jenense*, *Chromatium warmingii* (f. *minus*) und andere kleine Chromatien sowie *Thiopedia*, *Treponema* und *Chlorochromatium aggregatum*. Da es sich um eine über dem Schlammhorizont aus dem freien Wasser abgeheberte schlammfreie Suspension handelte, war die Probe nahezu frei von *Chlorobium*-Arten sowie von Grün- und Blaualgen.

Im Eisschrank bei $+5^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, hielten sich die Organismen im Wasser des natürlichen Standorts über 2 Monate lang schwärmend. Die derart vorrätig gehaltenen Organismen dienten als Impfmateriel für verschiedenartige Anreicherungskulturen. Neben rein synthetischen, mineralischen Nährlösungen, die nach den bisher bekannten Rezepten angesetzt worden waren, wurden im Rahmen des mikrobiologischen Kurses auch mit Schlamm und Calciumsulfat versehene Standzylinder beimpft. Es kamen drei verschiedene Schlammarten zur Verwendung: zwei Proben schwarzen Moders aus kleinen *Beggiatoa alba* enthaltenden Tümpeln aus dem Park Wilhelmshöhe bei Kassel und eine Frischschlammprobe aus dem Vorklär-Absetzbecken der Göttinger Kläranlage. Jede dieser Schlammarten wurde mit Zusätzen vermengt und etwa 3–7 cm hoch in 3 cm weite, 22 cm hohe Kulturgefäße (Reagensgläser) eingefüllt (im folgenden als „Schlammssäulen“ bezeichnet). Folgende Gemische wurden hergestellt:

1. Schlamm-Erde-Gemisch mit am Boden des Gefäßes befindlichem Gipsblöckchen, das ein erbsengroßes Stück K_2S eingeschlossen enthielt,
2. Schlamm-Erde-Gemisch mit etwa 0,6 g zerkleinertem Trockenfleisch auf dem Gefäßboden,
3. Schlamm-Erde-Gemisch (Volumenverhältnis 1:1) mit etwa einem viertel Volumenanteil gefällttem Calciumsulfat ($\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) und einigen Filtrierpapierschmitzeln (letzterer Zusatz erfolgte bei den Klärschlamm-Mischungen nicht).

Das Schlamm-Erde-Gemisch bestand aus einem Volumenteil Garten-erde (humoser Kalklehm Boden des Institutsgartens) und einem Volumen-

teil des betreffenden dickflüssigen Schlammes. In allen Fällen wurde der Brei mit Regenwasser bis 2 cm unter den Gefäßrand überschichtet und das Gefäß mit Aluminiumfolie abgedeckt. Die Schlammssäulen wurden am Fenster aufgestellt und nach 1 Woche mit je 0,5 cm³ der Ostrauer Bakteriensuspension beimpft.

Etwa 4 Wochen nach der Impfung (am 6. Juli 1959) entdeckten wir in einer der nach 3. mit Klärschlamm angesetzten Kulturen an der Lichtseite im oberen Teil des Schlammsatzes einen etwa quadratzentimetergroßen kalkig-purpurroten Fleck. Dieser Fleck war von einem 2–3 mm breiten kalkig-gelbbraunen Streifen überlagert. Die mikroskopische Betrachtung ließ die purpurfarbene Zone als eine dichte, reine Ansammlung von *Chromatium okenii* und die hellgelbbraune als eine Anhäufung von *Thiospirillum jenense* erkennen. Unbeimpft gelassene Parallelkulturen des gleichen Schlamm-Gemisches enthielten keine *Thiorhodaceae*; die Anhäufungen hatten sich also aus den eingeimpften Ostrauer Organismen entwickelt. Die unbeimpften Parallelkulturen wurden nachträglich von den Stellen der ersten Anreicherung beimpft. Daraufhin setzte auch in ihnen eine schnelle Vermehrung ein, erkennbar an den zunehmend dichter werdenden Wolken schwärmender Chromatien und Thiospirillen. Die mit frischem Klärschlamm, Erde und Calciumsulfat bereiteten Säulen boten also eine geeignete Grundlage für die Anreicherungskultur dieser großen Schwefelpurpurbakterien. In den nach 1. und 2. angesetzten Kulturen und bei Verwendung von Tümpelschlamm war keine Entwicklung dieser Organismen eingetreten. In allen späteren Ansätzen der gleichen Art fanden wir unsere erste Beobachtung immer wieder bestätigt.

2. Charakterisierung der Klärschlamm-Anreicherungskulturen

Der aus einem Absetzbecken der städtischen Kläranlage geschöpfte hellbraun-graue Frischschlamm ist eine nach Fäkalien riechende, gasende, nährstoffreiche Masse, welche über lange Zeit eine reiche Mikroorganismenflora erhält. In der Wasserschicht über einem homogenen Gemisch von Gartenerde und Frischschlamm bildet sich am Licht eine unterschiedlich gefärbte, dichte Organismenpopulation aus Bakterien, Protozoen und grünen Flaggellaten. Photoorganotrophe Athiorhodaceen gelangen darin zu üppiger Entwicklung. Solche Kulturen bestehen über Monate hin mit erstaunlich hoher Populationsdichte und langsam sich wandelnder Färbung.

Ganz anders entwickeln sich Schlammssäulen, deren Schlamm-Erde-Gemisch noch ein viertel Volumenanteil Calciumsulfat beigemischt ist (Abb. 5c). Werden die frisch beschickten Gefäße bei Raumtemperatur im Dunkeln gehalten, so weicht die anfangs hellbraun-graue Färbung des Schlammes allmählich einer tiefschwarzen; die Verfärbung breitet sich

sowohl von punktförmigen schwarzen Zentren in der Tiefe wie auch gleichmäßig von einer oberflächlichen schwarzen Schlammschicht aus. Die anfangs intensive Gasbildung durchsetzt die Schlammmasse mit Bläschen und treibt sie dadurch etwas auf. Zur Oberfläche durchblubbernde Gasblasen wirbeln den Schlamm auf; allmählich kommt es zur Klärung der überstehenden Lösung, und der anfängliche Fäkaliengeruch weicht einem intensiven Schwefelwasserstoffgeruch. Eine dicke, aus Bakterien,

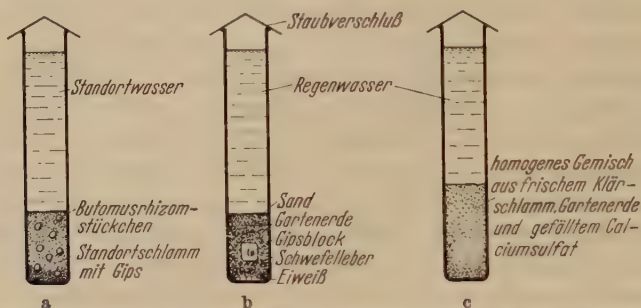


Abb. 5. Schlammsäulen-Anreicherungskulturen für Thiorhodaceen: a nach WINOGRADSKY (1888) mit *Butomus*-Rhizomstückchen, Gips und Thiorhodaceen enthaltendem Standortschlamm und -wasser; b nach SCHRAMMECK (1934) mit einer Spur organischem Material (Eiweiß, Trockenfleisch), Gartenerde, in Gipsblock eingeschlossener Schwefelleber (K_2S) und Sand. Impfung mit Thiorhodaceen notwendig; c homogenes Gemisch aus frischem Klärschlamm, Gartenerde und gefülltem Calciumsulfat im Volumenverhältnis 1:1:0,5 (vgl. Beschreibung S. 22). Impfung mit Thiorhodaceen notwendig

Pilzhyphen, Calciumcarbonatkristallen und elementarem Schwefel bestehende Kahmhaut schließt die Wasserschicht nach oben ab und erschwert den Gasaustausch mit der Atmosphäre. Das klare Schlammwasser hat einen pH -Wert zwischen 6,5 und 7,0. Die Beimischung gepulverten Calciumsulfats zum Klärschlamm-Erde-Gemisch schafft also Bedingungen, unter denen der Abbau der Schlammzersetzungserzeugnisse mit Sulfatreduktion und Schwefelwasserstoffentwicklung vor sich gehen kann.

Entscheidend für das richtige Einsetzen dieses Vorgangs ist die Temperatur, bei der die Gefäße aufgestellt werden. Bei 18–25°C dauern Schwefelwasserstoff- und Kohlensäurebildung monatelang an; im überstehenden, völlig klaren Schlammwasser lassen sich dann papierchromatographisch keine organischen Abbauprodukte (Fettsäuren und andere organische Säuren, Aminosäuren) nachweisen. Der Abbau der mit dem Frischschlamm eingebrachten organischen Substanzen geht demnach bei 18–25°C weitgehend in der Sulfatreduktion auf. Im Einklang damit steht die Beobachtung, daß in diesen Schlammsäulen die photoorganotrophen Athiorhodaceen stets nur als untergeordnete Begleitflora der eingepflichten Schwefelpurpurbakterien auftraten;

niemals gelangten sie zu einer Massenentwicklung. Wurden die Schlamm-säulen hingegen bei Temperaturen über 33°C aufgestellt, so kam die Sulfatreduktion gegenüber der Schlammzersetzung nicht stark genug in Gang. Organische Abbauprodukte häuften sich im faulig-sauer stinkenden, überstehenden Schlammwasser an und boten Athiorhodaceen und anderen organotrophen Bakterien ausgezeichnete Lebensbedingungen.

Neben der Temperatur beeinflusst auch die Dauer der Lagerung bis zur Beimpfung den Wert der Schlammssäulen als Anreicherungskultur-Medien für die Chromatien- und Thiospirillen-Zucht. Beim pften wir Säulen, die nach dem Anmischen 8–14 Tage dunkel gestanden hatten, so kamen am Tageslicht besonders im Sommer neben den eingepfften Organismen auch noch zahlreiche grüne Flagellaten, Blaualgen, Grünalgen, kleine Chromatien und Athiorhodaceen zur Entwicklung. Diese mit Frischschlamm und Erde eingeschleppten Organismen bleiben während der kurzen Lagerzeit und dem anfangs noch geringen H₂S-Gehalt entwicklungsfähig. Hatten die Schlammssäulen jedoch 2–3 Monate kühl und dunkel gestanden, so blieben die Anreicherungen von unerwünschten „säuleneigenen“ autotrophen Begleitorganismen fast immer frei und ermöglichten den eingepfften Organismen eine ungestörte üppige Vermehrung. Selbst 4–6 Monate lang gelagerte Schlammssäulen erlaubten eine gute Massenentwicklung, wenn der pH-Wert des Schlammwassers durch Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure von pH 7,2 auf 6,4–6,6 herabgesetzt war. In keinem Falle ließen sich *Thiospirillum jenense* und *Chromatium okenii* oberhalb pH 7,0 lebensfähig erhalten. Im Verlaufe der Vermehrung dieser Organismen in den Säulen trat ein allmähliches Absinken des pH-Wertes ein. Mehrere Monate alte, gut entwickelte Kulturen enthielten schwärmende Chromatien und Thiospirillen noch bei pH 5,2–5,4. Eine Vermehrung der Zellen war dann allerdings nicht mehr zu beobachten.

Als wir später dazu übergingen, unsere Schlammssäulen zur Anreicherung der großen Thiorhodaceen mit Teichwasser- und Schlammproben anderer Herkunft zu beimpfen, war es unvermeidbar, daß Blaualgen, grüne Flagellaten, Grünalgen und grüne Schwefelbakterien mit eingeschleppt wurden. In den zunächst am Tageslicht aufgestellten Kulturen gelangten diese Organismen zu starker Massenentwicklung; die selektive Anreicherung der großen Thiorhodaceen gelang dann nur, wenn die Kulturen in gefiltertem Licht aufgestellt wurden. Infrarotfilter als zusätzliche Selektionsbedingung hatte zuerst GAFFRON (1934) in die Laboratoriumspraxis eingeführt.

Die Schlammssäulen wurden in lichtdichten, mit Leitungswasser gekühlten Aquarien aufgestellt und durch seitlich angebrachte Infrarotfilter mit Glühlampenlicht (60 Watt, 10–20 cm Entfernung) belichtet. Zur Unterdrückung des Wachstums von Blau- und Grünalgen und grünen

Flagellaten verwendeten wir Gelatinefilter Nr. 101 der Fa. „Göttinger Farbfiler“. Diese sind erst oberhalb 700–750 $m\mu$ lichtdurchlässig. Die Vermehrung grüner Schwefelbakterien konnten wir unterdrücken durch Belichtung der Schlammssäulen hinter dem Infrarotfilter Nr. 530 der gleichen Firma. Die Lichtdurchlässigkeit dieses Filters erreicht bei 850 $m\mu$ etwa 50% und erst bei noch höheren Wellenlängen 90–100% des

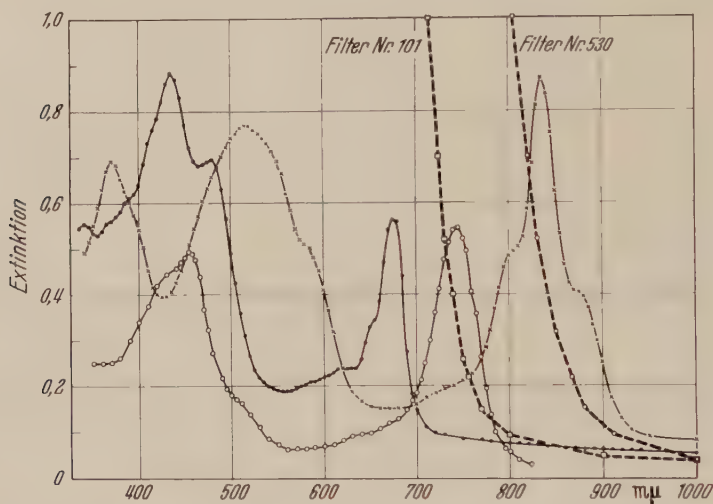


Abb. 6. Spektrale Absorptionskurven intakter Zellen von *Chromatium okenii*, Stamm Ostrau, *Chlorobium spec.* und *Chlorella pyrenoidosa* und der Gelatinefilter Nr. 101 und Nr. 530 (Hersteller „Göttinger Farbfiler“). Präparation und Messung vgl. Abb. 4. Die Absorptionskurve von *Chlorobium spec.* wurde aus BARER (1955) umgezeichnet übernommen. *Chromatium okenii* \times — \times , *Chlorobium spec.* \circ — \circ , *Chlorella pyrenoidosa* \bullet — \bullet , Filter Nr. 101 \square — — — \square , Nr. 530 \circ — — — \circ

auffallenden Lichtes. Als Lichtquelle diente in diesem Falle mit Vorteil eine auf der Rückwand verspiegelte 60 W-Soffitte, deren maximale Strahlungsintensität gegenüber anderen Glühlampen im längerwelligen Bereich liegt. Abb. 6 gibt die Absorptionsspektren lebender Zellen von *Chlorella*, *Chlorobium* und *Chromatium okenii* wieder und vergleichsweise dazu die Durchlässigkeit der Infrarotfilter Nr. 101 und 530.

3. Vermehrung und Erhaltung von *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* in Schlammkulturen

Die beschriebenen Schlammssäulen mit Klärschlamm-Erde-Calciumsulfat (Volumenverhältnis 1:1:0,5) bieten nach der für sie notwendigen Reifungszeit sowohl *Chromatium okenii* als auch *Thiospirillum jenense* ausgezeichnete Entwicklungsbedingungen (Abb. 5c). Beide Organismen erreichen in der überstehenden Flüssigkeit Populationsdichten, die am natürlichen Fundort bisher nie beobachtet werden konnten. Am Ostrauer

Standort war schon ein deutliches Nacheinander in der Massenentwicklung von *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* festgestellt worden (vgl. S. 14—15). Diese Erscheinung wiederholte sich stets auch in unseren Schlammssäulen und deutet damit auf weitgehende Entsprechungen der Lebensbedingungen hin.

Impften wir eine Schlammssäule mit etwa gleichen Mengen beider Arten, so entwickelte sich *Chromatium okenii* in der 1. Woche (20°C, Tageslicht) von einem gerade sichtbaren purpurnen Schleier auf der schwarzen Schlammoberfläche zu einer mehrere Zentimeter hohen, dichten, purpurroten Wolke. Nach 2—3 Wochen erfüllten die schwärmenden Chromatien die ganze Wassersäule bis 0,5 cm unter die Oberfläche in dichter weinroter Suspension (vgl. Abb. 7). *Thiospirillum jenense* entwickelte sich in dieser Zeit zunächst als langsam sich verbreiternde hellgelbbraune Schicht auf der Schlammoberfläche. Erst wenn die schwärmende Massenanreicherung von *Chromatium okenii* nach mehreren Wochen dünner wurde und sich an der Lichtseite im oberen Teil des Schlammes purpurrote Flächen ausgebildet hatten, trat *Thiospirillum jenense* in eine entsprechende Massenvermehrung ein. Die entstehende Population erhielt sich dann in erstaunlicher Dichte über mehrere Monate hin schwärmend. Während dieser ganzen Entwicklung durchlief die Kultur Stadien, in denen die beiden Arten sich vollständig durchmischt hielten. Gelegentlich entmischten sie sich jedoch zu zwei „Bakterienplatten“, die in mehr oder weniger großem Abstand übereinander schwebten und in denen jede Art von der anderen nahezu frei war. Es gelang dann leicht, beide Organismen getrennt abzuimpfen und sie isoliert weiterzukultivieren.

Beide Purpurbakterienarten zeigten in den Schlammssäulen bei verschiedenen Lichthelligkeiten übereinstimmende Schwärmbewegungen: Bei Dunkelheit und diffusem Tageslicht schwärmten sie in der ganzen Flüssigkeitssäule bis dicht unter die Oberfläche. Mit steigender Helligkeit verdichtete sich die Schwärmzone mehr und mehr zu einer kompakten Schicht auf der Schlammoberfläche.

Die Populationen von *Chromatium okenii* sind je nach Alter der Anreicherungskultur verschieden gefärbt; für kleine *Chromatium*-Arten wurde dies bereits von VAN NIEL (1932) treffend beschrieben. Junge Anhäufungen in frischen, H₂S-reichen Lösungen erscheinen pastellfarben-purpurrot. Die Einzelzellen enthalten dann sehr viele Schwefeltröpfchen und das Plasma erscheint fast farblos. Im Laufe von Wochen und Monaten vertieft sich das Purpurrot bis zum Weinrot und der pastellfarbene Charakter der Färbung weicht einem lackartigen. Die Einzelzellen sind dann weitgehend frei von Schwefeltröpfchen und das Plasma erscheint hellpurpurrot. Entsprechende Veränderungen des Farbcharakters sind an Kulturen von *Thiospirillum jenense* zu beobachten.



Abb. 7. Klärschlamm-Anreicherungskulturen verschiedener Schwefelbakterienarten. Von links nach rechts *Chromatium okenii*, Stamm Ostrau, *Thiospirillum jenense*, Stamm Ostrau, *Chromatium warmingii*, *Chlorobium limicola* und *Chromatium okenii*, Stamm Ostrau; ein Drittel natürliche Größe



Abb. 12. Anreicherungskulturen in halbsynthetischer Nährlösung: linke Flaschen: *Chromatium okenii*, Stamm Ostrau; rechte Flaschen: *Chromatium warmingii*; ein Drittel natürliche Größe

Die ersten Anreicherungen im H_2S -reichen Schlammwasser erscheinen infolge des hohen Gehalts an Schwefeltröpfchen der Einzelzellen kalkig-gelbbraun. Bei älteren Kulturen vertieft sich die Färbung nach lackartig orangebraun. Das Plasma der Einzelzellen erscheint dann hellgrünlich-gelbbraun und ist nahezu frei von Schwefel. Als „orangebraun“ bezeichnete bereits BUDER (1915) den Farbton größerer Anhäufungen von Thiospirillen.

4. Anreicherung weiterer Arten und Stämme

Chromatium warmingii (f. minus)

In der Folgekultur einer ursprünglich mit der Ostrauer Teichwasserprobe beimpften Schlammkultur kam nach mehrmonatigem Stehen spontan eine weitere *Chromatium*-Art zur Massenentwicklung. Die besonders dicht erscheinenden Schwärmzonen dieses Organismus blieben stets unmittelbar in und auf der Schlammoberfläche und breiteten sich nie höher als 2–5 cm in die überstehende Flüssigkeitssäule aus. Im Unterschied zu *Chromatium okenii* wiesen die Massenanhäufungen eine kalkig-violett-purpurne Färbung auf. An der charakteristisch polständigen Anordnung der Schwefeltröpfchen und den Größenverhältnissen erkannten wir den Organismus nach den Beschreibungen von COHN (1875), BEIJERINCK (1893) und BAVENDAMM (1924) als *Chromatium warmingii* (vgl. S. 5–6 u. Abb. 3). Ebenso wie die beiden anderen Purpurbakterienarten hielt sich *Chromatium warmingii* in den Schlammssäulen bei hoher Populationsdichte monatelang schwärmend.

Chromatium okenii, Stamm „Reyershausen“

Im Herbst 1959 erhielten wir durch Herrn BREUKER eine purpurrote Schlammwasserprobe aus einem langsam durchströmten kleinen Erlenbruch-Tümpel bei Reyershausen (nördlich von Göttingen). Mikroskopisch waren neben großen Mengen kleiner Chromatien vom Typ des *Chromatium vinosum* vereinzelt Zellen von *Chromatium okenii* zu erkennen. Wir beimpften zwei Schlammssäulen aus dieser Probe und stellten sie hinter Infrarotfilter Nr. 101 auf, um die Weiterentwicklung der reichlich darin enthaltenen Grün- und Blaualgen zu verhindern. Nachdem in den ersten Wochen eine Massenentwicklung von *Chromatium vinosum* völlig zurückgegangen war, begann sich *Chromatium okenii* in dichten Wolken anzureichern. Überimpfungen in neue Schlammssäulen entwickelten sich ebenso schnell und kräftig, wie der *Chromatium okenii*-Stamm aus der Ostrauer Teichwasserprobe.

Der neu isolierte *Okenii*-Stamm „Reyershausen“ unterschied sich vom Stamm „Ostrau“ morphologisch durch stärkere Krümmung der Zellen (vgl. Abb. 8). Außer im ruhenden Zustand ist dieser gestaltliche Unterschied besonders deutlich zu sehen an schwimmenden Zellen, deren

Rotationskörper nicht tonnenförmig, sondern nach vorne trichterförmig verbreitert erscheint. Es ließen sich bisher keine weiteren Unterschiede zwischen den beiden Stämmen erkennen.

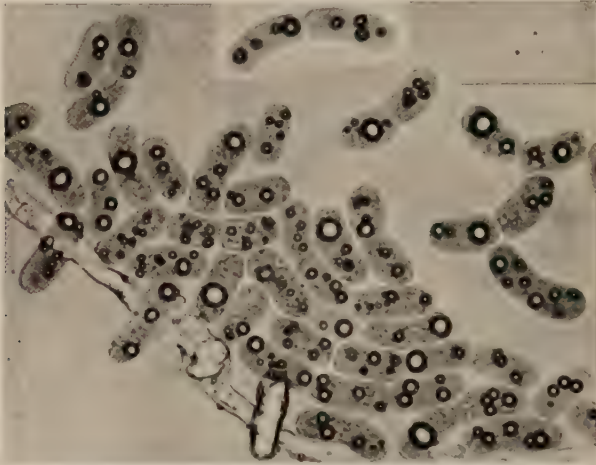


Abb. 8. *Chromatium okenii* (Perty), Stamm Reyershausen aus Klärschlamm-Anreicherungskultur. Hellfeld-Lebendaufnahme; Gesamtvergr. 960 mal



Abb. 9. *Thiospirillum jenense* (Winogradsky), Stamm Göttingen aus Klärschlamm-Anreicherungskultur. Hellfeld-Lebendaufnahme; Gesamtvergr. 960 mal

Thiospirillum jenense, Stamm „Göttingen“

Im Winter 1959/60 regte uns Herr Dr. W. KOCH (Inst. f. Pflanzenphysiologie, Göttingen) an, eine Probe aus dem Teich des Botanischen Gartens zu untersuchen, dessen Bodenschlammzone sich gerade in einer

Phase besonders starker Schwefelwasserstoffentwicklung befand. Zentrifugate des Teichwassers schienen lediglich *Chromatium weissii* zu enthalten. In Schlammsäulen, die wir mit der Probe beimpften, entwickelten sich jedoch nur *Chlorobium limicola* und *Thiospirillum jenense*. Folgekulturen, die wir hinter Infrarotfilter Nr. 530 belichteten, ermöglichten uns, reine Anreicherungen des *Thiospirillum*-Stammes zu gewinnen und dauernd in Kultur zu halten.

Bei mikroskopischer Betrachtung unterscheidet sich der *Thiospirillum*-Stamm „Göttingen“ von unserem zuerst angereicherten Stamm „Ostrau“. Breite und Länge der Einzelzellen sind bei beiden Stämmen im Mittel etwa gleich; jedoch ist die Weite des Schraubengangs bei den Zellen des Göttinger Stammes kleiner (vgl. Abb. 9), so daß der Rotationskörper der schwärmenden Spirillen schlank stäbchenförmig erscheint. Demgegenüber bleibt bei dem Ostrauer Stamm auch während der Bewegung die stark spirale Form der Einzelzelle am Rotationskörper leicht erkennbar.

Chlorobium limicola, *Chlorochromatium aggregatum*
und *Amoebobacter* spec.

In Rohkulturen der mit Reyershäuser Teichwasser beimpften Schlammsäulen kam *Chlorochromatium aggregatum* gelegentlich zu stärkerer Vermehrung. In länger stehenden Schlammsäulen reicherte sich später *Chlorobium limicola* als kalkig-gelbgrüne, bis mehrere Zentimeter hohe Schicht auf der Schlammoberfläche an. Säulen, die wir viele Wochen lang hinter Infrarotfilter Nr. 530 belichtet hatten, enthielten in der ganzen über dem Schlamm stehenden Wasserschicht gleichmäßig verteilt kalkig-violette, dichte Massen von *Amoebobacter* (WINOGRADSKY). In jedem Falle gelang es uns, durch Abimpfungen aus Massenansammlungen dieser einzelnen Organismen zu Folgekulturen zu gelangen, in denen eine der gerade gewünschten Arten fortgezüchtet werden konnte.

In der Wasserprobe des natürlichen Standorts glich die in Schleimhüllen Zellfamilien bildende unbewegliche Purpurbakterienart der von WINOGRADSKY (1888, Tafel III, Abb. 2) als *Amoebobacter roseus* beschriebenen Art. In der Schlammsäulen-Anreicherungskultur vermehrte sich der Organismus hingegen weitgehend in Form von Einzelzellen. Er konnte dann nach der Beschreibung von MOLISCH (1907) auch als *Rhodotherce pendens* angesprochen werden. Die für den Organismus typischen „Höhlungen“ (WINOGRADSKY) bzw. „Airosomen“ (MOLISCH, vgl. Abb. 10a) verschwanden für einige Stunden, wenn die Zellen bei 5000 U/min abzentrifugiert worden waren (Abb. 10b). In den folgenden 10–20 Std bildeten sie sich dann aber allmählich wieder deutlich aus.

Aus dem Dargestellten geht hervor, daß Anreicherungskulturen von *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* nicht nur mit Impfmateriel eines einzigen natürlichen Standorts gelangen. Beide Arten ließen sich in

gleichartigen Schlammssäulen auch noch aus Proben je eines anderen natürlichen Gewässers anreichern und fortzüchten. Die Laboratoriumskulturen der großen *Thiorhodaceae* in den Schlammssäulen bestehen bei uns nun schon über 1 Jahr mit gleichbleibend guter Entwicklung. Auch ließen sich die Arten in diesem Jahr im mikrobiologischen Kurs erneut aus natürlichen Wasserproben in den Schlammssäulen anreichern. Es

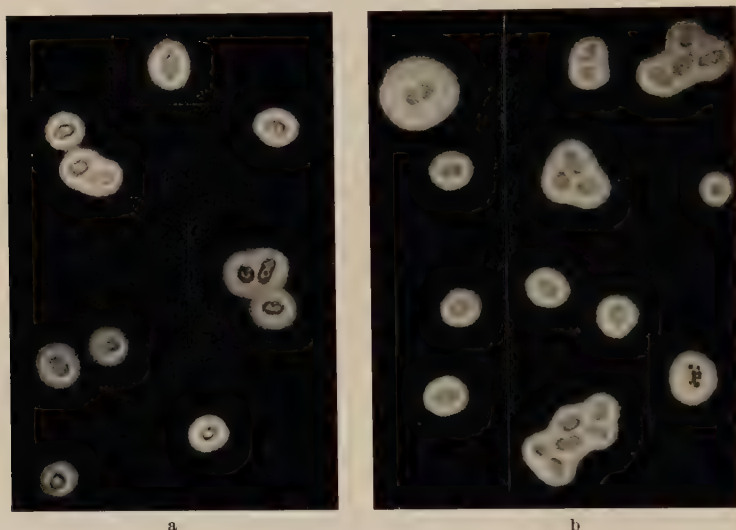


Abb. 10. *Amoebobacter* spec. (Winogradsky) aus Klärschlamm-Anreicherungskultur. Hellfeld-Lebendaufnahmen von Tuschepräparaten zur Darstellung der Schleinhüllen. Erklärung im Text. Gesamtvergr. 960 mal

darf deshalb gesagt werden, daß die mit frischem Klärschlamm, Erde und Calciumsulfat angesetzten Schlammssäulen günstige Entwicklungsbedingungen für sechs photosynthetisch lebende Schwefelbakterienarten darbieten.

IV. Entwicklung einer halbsynthetischen Nährlösung für *Chromatium okenii* und *Chromatium warmingii*

In den bisher dargestellten Schlamm-Anreicherungskulturen konnten wir die isolierten Schwefelpurpurbakterien-Stämme jederzeit in größeren Mengen heranzüchten und als Impfmateriel für Versuchsansätze verwenden. Wir beschränkten uns zunächst auf Untersuchungen mit *Chromatium okenii* Stamm Ostrau.

Alle Bemühungen verliefen erfolglos, *Chromatium okenii* in einer der bisher für die Kultur von Chromatien angewendeten vollsynthetischen Nährlösungen zu züchten oder auch nur längere Zeit darin am Leben zu erhalten. Wir schlugen deshalb den nächstliegenden Weg ein und ver-

wendeten „Schlammwasser“ als Nährlösungsgrundlage. Durch schrittweise Veränderungen dieser Nährlösungsbasis und vorsichtigen Zusatz von Nährsalzen wollten wir die Lebensbedürfnisse unserer Organismen ermitteln und damit die Lebensbedingungen kennenlernen, die in einer vollsynthetischen Nährlösung herzustellen sind.

Um genügend Schlammwasser zu gewinnen, überschichteten wir in 10 l-Glasflaschen die bewährte Schlammischung (frischer Klärschlamm: Erde: $\text{CaCS}_4 = 1:1:0,5$) mit dem fünffachen Volumen Regenwasser und lagerten diese Ansätze bei $15-20^\circ\text{C}$ mehrere Wochen im Dunkeln. Aus der überstehenden Flüssigkeit ließ sich dann je nach Bedarf satzfreies, klares, stark H_2S -haltiges Wasser entnehmen und direkt als Nährlösungsgrundlage verwenden (im folgenden einfach als „Schlammwasser“ bezeichnet.) Nach jeder Entnahme wurden die Flaschen wieder mit Regenwasser aufgefüllt.

Kulturversuche wurden in Schraubkappen-Reagensgläsern angesetzt, mit 0,5–1 ml gut schwärmenden Zellen aus Schlammssäulen beimpft und bei $18-22^\circ\text{C}$ in Aquarien im gefilterten Licht bebrütet (Infrarotfilter Nr. 101, 60 Watt-Glühlampe im Abstand von 20 cm).

Die Größe der Einzelzellen von *Chromatium okenii* ermöglicht bei lichtmikroskopischer Lebendbeobachtung förderliche oder ungünstige Wirkungen der gebotenen Lebensbedingungen an kleinen Veränderungen der Verhaltensweise und Beschaffenheit der Zellen direkt abzulesen. Wir beachteten folgende Verhältnisse:

a) Bewegung oder Stillliegen der Organismen; schnelle oder träge Bewegung, gleichmäßig geradliniges Schwimmen oder eng kreisendes oder stoßweises Fortbewegen (z. B. bei Teilungsstadien mit Geißeln an beiden Enden).

b) Größe und Wohlgeformtheit der Zellen, Vorhandensein von Teilungsstadien und anormalen, verkrüppelten Formen.

c) Vorhandensein, Größe und Anordnung der Schwefeltröpfchen sowie von farblosen „Reservestoff“-Granula und von Vacuolen in den Zellen.

d) Farbintensität der Zellen von fast farblos bis hellpurpurrot.

Bei Beobachtung dieser Verhältnisse ließ sich kurzfristig feststellen, ob die hergestellte Kulturlösung dem Organismus angemessene Lebensbedingungen bot. Ein direkt sichtbarer Vermehrungserfolg — oder Mißerfolg — brauchte deshalb in vielen Fällen gar nicht erst abgewartet zu werden.

In Ansätzen mit reinem Schlammwasser, dem entweder 0,05% neutralisiertes $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ oder 0,1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zugesetzt worden war, hielt sich *Chromatium okenii* in einem pH -Bereich von 6,0–6,8 über eine Woche schwärmend im ganzen Glas. In den Gläsern mit Thiosulfat-Zusatz blieben die Zellen nach einigen Tagen dauernd schwefelfrei. Eine deutlich sichtbare Vermehrung erfolgte bei diesen Versuchsansätzen in

keinem Falle. Demgegenüber können sich die Organismen im Schlammwasser der Anreicherungskulturen über Schlammbodensatz offenbar deshalb vermehren, weil ihnen aus der Schlammzersetzung fortwährend neue Nährsubstanzen zukommen. Um in dem reinen Schlammwasser eine Vermehrung zu erhalten, mußten diesem also noch Mineralsalze zugesetzt werden. Um Fettsäuren, organische Säuren oder Aminosäuren konnte es

Tabelle 1. Zusammensetzung der Nährlösung A

Wasser	1000 ml	KH_2PO_4	1 g
Vitaminlösung I	10 ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Hoaglandsche		NaHCO_3	2 g
Spurenelementlösung a	1,5 ml	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg	CaCO_3	0,05 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g	$\text{pH } 6,5$	
KCl	0,5 g		

Vitaminlösung I enthält auf 100 ml Aqua dest.:

0,1 mg Biotin	2,0 mg Nicotinsäure
0,1 mg Ca-Pantothenat	2,0 mg Aneurin
1,0 mg para-Aminobenzoessäure	

sich bei den notwendigen Nährsubstanzen nicht handeln, da Zusätze einzelner dieser Stoffe (Acetat, Malat, Succinat, Glutaminat und andere) in Mengen von nur 5 mg/100 ml Nährlösung innerhalb von 1–2 Tagen

Tabelle 2

Nr.	Mit Schlammwasser angesetzte Nährlösung A	Reines Schlammwasser	
	Volumenanteile	Volumenanteile	
1	0	+	100
2	20	+	80
3	35	+	65
4	50	+	50
5	65	+	35
6	100	+	0

pH -Wert der Lösungen vor dem Beimpfen: 6,3–6,6.

zu einer Massenvermehrung der in geringer Zahl vorhandenen *Athiorhodaceae* (wahrscheinlich *Rhodopseudomonas capsulatus*) führte und *Chromatium okenii* ganz überwachsen wurde.

Es wurde eine Mineralsalzlösung üblicher Zusammensetzung mit Spurenelementen und Vitaminen in Schlammwasser angesetzt (vgl. Tab. 1). Diese Lösung wurde in verschiedenen Volumenverhältnissen

reinem Schlammwasser beigemischt (Tab. 2), um die günstigste Nährsalzkonzentration für eine Vermehrung von *Chromatium okenii* festzustellen. Von einer Sterilisation der Lösungen wurde vorerst abgesehen. Das Ergebnis des Versuches läßt sich so zusammenfassen:

1. Schlammwasser ohne Zusatz von Nährsalzlösung:

Die eingeimpften Zellen von *Chromatium okenii* schwärmten einige Tage im ganzen Rohr. Es trat keine sichtbare Vermehrung ein. Nach einer

Woche setzten sich die Zellen auf dem Boden des Röhrchens ab. Die überstehende Lösung blieb klar.

2. und 3. Schlammwasser mit 20 und 35% Nährsalzlösung:

Das Impfmateriel setzte sich zunächst ab und hielt sich bei Nr. 2 2 Tage, bei Nr. 3 3—4 Tage in dichter Wolke am Boden schwimmend. An der Größenzunahme der weinroten Wolke schwärmender Zellen war die Vermehrung der eingepflichten Zellmenge gut zu erkennen. An den folgenden Tagen schwärmten die Organismen besonders in den Gläsern Nr. 2 fast gleichmäßig in der ganzen Flüssigkeit, während bei Nr. 3 außer den nach oben in abnehmender Menge schwärmenden Zellen noch eine dichte purpurrote Wolke am Boden des Glases blieb. Am 6. Kulturtag erhielten alle Gefäße 0,05% Na_2S -Zusatz. Nach anfänglich vollständigem Absetzen schwärmten die Zellen in den folgenden Tagen bei beiden Konzentrationen (Nr. 2 und 3) gleichmäßig im ganzen Glas. Die intensivere Purpurfärbung der Kulturen Nr. 3 ließ erkennen, daß eine stärkere Zellvermehrung eingetreten war.

4., 5. und 6. Schlammwasser mit 50, 65 und 100% Nährsalzlösung:

In allen diesen Kulturen trat auch nach längerer Zeit (14—21 Tage) kein Schwärmen der Zellen in der ganzen Flüssigkeit auf. Nur in den Ansätzen Nr. 4 und 5 kam es zu einer guten Vermehrung des Impfmateriels im Bodensatz. Die unverdünnte Nährsalzlösung (Nr. 6) erlaubte *Chromatium okenii* praktisch keine Vermehrung.

Der Versuch zeigt, daß die Zellen bei steigender Nährsalzkonzentration immer weniger stark schwärmen und sich schließlich auch nicht mehr vermehren. Nach allen bisherigen Beobachtungen an den großen Thiorhodaceen sehen wir das Schwärmen der Zellen in der ganzen Flüssigkeit während bestimmter Entwicklungsphasen der Kultur als ein Zeichen wirklich angemessener Lebensbedingungen an. Nun erfordert das von uns angewendete Prinzip der statischen Kultur, die Organismen bereits bei Kulturbeginn mit Nährsalzvorräten für die ganze Entwicklung in einem Gefäß zu versorgen. Bei der Wahl einer geeigneten Konzentration aller notwendigen Nährsalze war also ein Kompromiß zu schließen: die zugesetzten Mengen sollten klein genug sein, um das Schwärmen und das normale Wachstum des Organismus nicht zu beeinträchtigen; sie mußten aber auch hoch genug sein, um eine befriedigende Massenzunahme zu ermöglichen. Bei allen folgenden Experimenten verwendeten wir Nährlösungen mit dem uns am geeignetsten erscheinenden Konzentrationsverhältnis: 35 Teile Nährlösung A zu 65 Teilen Schlammwasser. Dabei konnte ohne Nachteil für die Entwicklung des Organismus das Drittel Nährlösung A mit Regenwasser (später auch deionisiertem Wasser) angesetzt werden.

In dieser „halbsynthetischen Nährlösung“ ließ sich sowohl *Chromatium okenii* als auch *Chromatium warmingii* in schwärmendem Zustand bis zu

hohen Populationsdichten heranzüchten, wenn nach der jeweiligen Umsetzung des Sulfids dessen Konzentration wieder zu 0,05% ergänzt wurde. Bei 100 ml fassenden Kulturgefäßen hatte dies bis zum Auswachsen der Kultur drei- bis viermal in Abständen von etwa 4—6 Tagen zu geschehen.

Bei einem späteren Ansatz mit sterilfiltrierter halbsynthetischer Nährlösung (Seitz-Filter: EK) und Zugabe von autoklaviertem, verflüssigtem Agar bei 45°C (Endkonzentration 1,0%), konnten mit der zuerst von

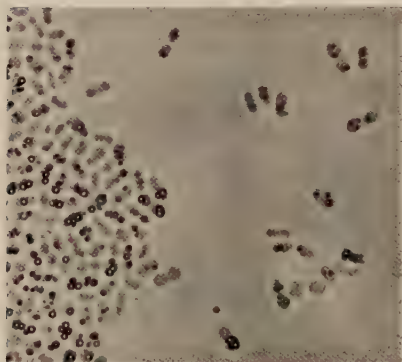


Abb. 11 *Chromatium vinosum* (Winogradsky). Monokultur in halbsynthetischer Nährlösung. Hellfeld-Lebendaufnahme; Gesamtvergrößerung 960 mal

VAN NIEL (1932) bei Chromatien angewendeten Methodik in Paraffin-verschlossenen Reagentgläsern Einzelkolonien sowohl von *Chromatium okenii* als auch von *Chromatium warmingii* erhalten werden. Einzelne isolierte Kolonien wuchsen in flüssiger Nährlösung der gleichen Zusammensetzung zu schwärmenden Kulturen heran. Aus den angelegten Agarröhrchen wurde bei dieser Gelegenheit auch eine zur Entwicklung gekommene Kolonie einer kleinen Chromatiumart vom Typ *Chromatium vinosum* isoliert und in der gleichen Nährlösung fortgezüchtet (vgl. Abb. 11).

Wir erhielten uns diese Monokulturen in sterilfiltrierter halbsynthetischer Nährlösung in 100 ml Schraubverschlußflaschen bei vierwöchentlicher Überimpfung. Sie dienten als Ausgangsmaterial für weitere Versuchsansätze, die zur Auffindung einer vollsynthetischen Nährlösung führen sollten (siehe Abb. 12, S. 28).

Alle Versuche, *Thiospirillum jenense* auch in halbsynthetischer Nährlösung zu kultivieren, blieben bisher erfolglos. In der für *Chromatium okenii* geeigneten Nährlösung (Schlammwasser 65, Nährlösung A 35 Volumenanteile) trat eine Vermehrung dieser Organismen nur in der ersten aus der Schlammsäule beimpften Kultur ein. In gleichartig angesetzten Folgekulturen entwickelten sich die Thiospirillen jedoch nicht mehr weiter. Durch Verändern der Nährlösungskomponente versuchen wir auch weiterhin zu einer geeigneten halb- oder vollsynthetischen Nährlösung für diese Organismen zu gelangen.

Zusammenfassung

Es werden Beobachtungen mitgeteilt über die Entwicklungsbedingungen und Art des Auftretens der großen *Thiorhodaceae* *Chromatium okenii* und *Thiospirillum jenense* an einem natürlichen Standort. Die beiden Arten kommen nacheinander zu ihrer Massenentwicklung.

Eine besondere Art von Schlammsäulen-Anreicherungskulturen aus frischem Klärschlamm, Erde und gefällttem Calciumsulfat wird beschrieben, mit denen es möglich ist, folgende Schwefelpurpurbakterienarten im Laboratorium anzureichern und dauernd in Kultur zu erhalten: *Chromatium okenii*, *Chromatium warmingii*, *Thiospirillum jenense* und *Amoebobacter spec.*

Für *Chromatium okenii* und *Chromatium warmingii* wird eine halbsynthetische Nährlösung angegeben. Sie ermöglichte es bei beiden Arten, von Einzelkolonien in Agar zu Monokulturen in Schraubverschlußflaschen zu gelangen.

Die spektralen Absorptionskurven lebender Zellen folgender Thiorhodaceen-Arten sind angegeben: *Chromatium okenii*, *Chromatium warmingii*, *Chromatium vinosum*, *Amoebobacter spec.*, *Thiospirillum jenense*. Sie geben einen ersten Hinweis auf die Natur der vorkommenden Pigmente und ihr Mengenverhältnis.

Ausgeführt mit Apparaten, die uns die Deutsche Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt hat.

Literatur

- BARER, R.: Spectrophotometry of clarified cell suspensions. Science **121**, 709—715 (1955).
- BAVENDAMM, W.: Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Süß- und Salzwassers. Pflanzenforsch. **2**, 1—156 (1924).
- BAVENDAMM, W.: Kultur der am Kreislauf des Schwefels beteiligten Bakterien. Abderhald. Hdb. **12**, 483—546 (1934).
- BAVENDAMM, W.: Physiologie der schwefelspeichernden und schwefelfreien Purpurbakterien. Ergebn. Biol. **13**, 1—53 (1936).
- BEIJERINCK, M. W.: Über die Atmungsfiguren beweglicher Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. **14**, 827—845 (1893).
- BERGERON, J. A., and R. C. FULLER: Influence of carotenoids on the infra-red spectrum of bacteriochlorophyll in *Chromatium*. Nature (Lond.) **184**, 1340—1341 (1959).
- BUDER, J.: Zur Kenntnis des *Thiospirillum jenense* und seiner Reaktion auf Lichtreize. Jb. Bot. **56**, 529—584 (1915).
- BUDER, J.: Zur Biologie des Bacteriopurpurins und der Purpurbakterien. Jb. Bot. **58**, 525—628 (1919).
- BUDER, J.: Aus der Biologie der Purpurbakterien. Naturwissenschaften **8**, 262—268 (1920).
- COHN, F.: Untersuchungen über Bakterien. II. Beitr. Biol. Pflanz. **1**, 141—207 (1875).
- CRAMER: zitiert nach COHN, F. (1875): Untersuchungen über Bakterien III. Beitr. Biol. Pflanz. **1**, 178 (1870).
- DUYSENS, L. N. M.: Transfer of excitation energy in photosynthesis. Thesis, Utrecht 1—96 (1952).
- EHRENBERG, C. G.: Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen. Leipzig: L. Voss-Verlag 1838.
- ENGELMANN, TH. W.: Bacterium photometricum. Ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Licht- und Farbensinns. Pflügers Arch. ges. Physiol. **30**, 95 (1883).

- ENGELMANN, TH. W.: Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht. Bot. Z. **46**, 661 (1888).
- ENGELMANN, TH. W.: Über Bacteriopurpurin und seine physiologische Bedeutung. Pflügers Arch. ges. Physiol. **42**, 183—186 (1888).
- EWART, A. J.: On the evolution of oxygen from coloured bacteria. J. Linnean Soc. Bot. **33**, 123—155 (1897).
- FISCHER, H., u. J. HASENKAMP: Über die Konstitution des Farbstoffs der Purpurbakterien und über 9-Oxy-desoxy-phäoporphyrin 1. Liebigs Ann. **515**, 148—164 (1935).
- FISCHER, H., R. LAMBRECHT u. H. MITTENZWEI: Über Bacterio-Chlorophyll. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **253**, 1—39 (1938).
- GAFFRON, H.: Über die Kohlensäure-Assimilation der roten Schwefelbakterien. Biochem. Z. **269**, 447—453 (1934).
- GAFFRON, H.: Über die CO₂-Assimilation der roten Schwefelbakterien. Biochem. Z. **279**, 1—33 (1935).
- GRIFFITHS, M., and R. Y. STANIER: Some mutational changes in the photosynthetic pigment system of *Rhodospseudomonas spheroides*. J. gen. Microbiol. **14**, 698 to 715 (1956).
- JENSEN, S. L., G. COHEN-BAZIRE, T. O. M. NAKAYAMA and R. Y. STANIER: The path of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium. Biochim. biophys. Acta **29**, 477—498 (1958).
- KEIL, F.: Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. Beitr. Biol. Pflanz. **11**, 335—372 (1912).
- KOLKOWITZ, R., u. M. MARSSON: Ökologie der pflanzlichen Saprobien. Ber. dtsh. bot. Ges. **26a**, 505—519 (1908).
- KOLKOWITZ, R.: Über die Geißeln der Schwefelbakterie *Chromatium okenii*. Ber. dtsh. bot. Ges. **45**, 30 (1927).
- LÉVY, R., G. THEISSIER et R. WURMSER: Étude des pigments d'une Bactériacée sulfureuse: *Chromatium okenii* Perty. Ann. Physiol. Physicochim. biol. **1**, 298—311 (1925).
- LIESKE, R.: Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von *Spirophyllum ferrugineum* Ellis, einem typischen Eisenbacterium. J. wiss. Bot. **49**, 91—127 (1911).
- LWOFF, A., and C. B. VAN NIEL: Nomenclature of Nutritional Types of Microorganisms. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **11**, 302—303 (1946).
- MANTEN, A.: The isolation of *Chromatium okenii* and its behaviour in different media. *Antonie v. Leeuwenhoek* **8**, 164—168 (1942).
- MITTENZWEI, H.: Über Bacteriochlorophyll. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **275**, 93—121 (1942).
- MOLISCH, H.: Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen. Jena: Fischer-Verlag 1—95 (1907).
- NIEL, C. B. VAN: On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. Arch. Mikrobiol. **3**, 1—112 (1932).
- NIEL, C. B. VAN: On the metabolism of the Thiorhodaceae. Arch. Mikrobiol. **7**, 323—358 (1936).
- NIEL, C. B. VAN: The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. *Advanc. Enzym.* **1**, 263—328 (1941).
- NIEL, C. B. VAN: The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur-purple and brown bacteria. *Bact. Rev.* **8**, 1—118 (1944).
- NIEL, C. B. VAN: The Comparative Biochemistry of Photosynthesis. FRANCK, J., and W. E. LOOMIS: Photosynthesis in Plants, Iowa 437 (1949).
- NIEL, C. B. VAN: The chemoautotrophic and photosynthetic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **8**, 105—132 (1954).

- NIEL, C. B. VAN: Natural selection in the microbial world. *J. gen. Microbiol.* **13**, 201—217 (1955).
- NIEL, C. B. VAN: Rhodobacteriineae. *Bergey's Manual of Determinative Bact.*, 7. Aufl. Baltimore, 35—67 (1957).
- NOACK, K., u. E. SCHNEIDER: Ein chlorophyllhaltiger Bakterienfarbstoff. *Naturwissenschaften* **21**, 835 (1933).
- PERTY, M.: Zur Kenntnis kleinster Lebensformen. Bern 1—228 (1852).
- PRINGSHEIM, E. G.: Neues über Purpurbakterien. *Naturwissenschaften* **20**, 479 bis 483 (1932).
- ROELOFSEN, P. A.: On the metabolism of the purple sulphur bacteria. *Proc. kon. ned. Acad. Wet.* **37**, 660—668 (1934).
- ROELOFSEN, P. A.: On photosynthesis of the Thiorhodaceae. Dissertation, Utrecht 1935.
- SCHLEGEL, H. G.: Vergleichende Untersuchungen über die Lichtempfindlichkeit einiger Purpurbakterien. Dissertation. Halle/Saale 1950.
- SCHLEGEL, H. G.: *Arch. Protistenkde.* **101**, 69—97 (1956).
- SCHRAMMECK, J.: Untersuchung über die Phototaxis der Purpurbakterien. *Beitr. Biol. Pflanz.* **22**, 315—380 (1934).
- SISTROM, W. R., and M. GRIFFITHS: A note on the porphyrins excreted by the blue-green mutant of *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. cell. comp. Physiol.* **48**, 459—516 (1956).
- SKENE, M.: A contribution to the physiology of the purple sulphur bacteria. *New Phytologist* **13**, 1 (1914).
- THOMAS, J. G., J. C. GOEDHEER and J. G. KOMEN: pH-induced changes of the infrared absorption spectra of purple bacteria. *Biochim. biophys. Acta* **22**, 1—8 (1956).
- THOMAS, J. G., L. C. GOEDHEER and J. G. KOMEN: pH-dependence of bacteriochlorophyll fluorescence in aqueous extracts of purple bacteria. *Biochim. biophys. Acta* **22**, 342—348 (1956).
- WASSINK, E. C., E. KATZ and R. DORRESSTEIN: Infra-red absorption spectra of various strains of purple bacteria. *Enzymologia* **7**, 113—129 (1939).
- WASSINK, E. C., and A. MANTEN: Some observations on the utilization of organic compounds by purple sulphur bacteria. *Antonie v. Leeuwenhoek* **8**, 155—163 (1942).
- WINOGRADSKY, S. N.: Die Schwefelbakterien. *Bot. Z.* **45**, 489 (1887).
- WINOGRADSKY, S. N.: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. Leipzig, 1—120 (1888).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Morphologische und physiologische Eigenschaften einiger aus Schafpansen isolierter Bakterienstämme

Von

RUTH STELLMACH-HELGWIG

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. August 1960)

Seit einer Reihe von Jahren erregt die Flora des Pansens zunehmendes Interesse. Die besonderen Lebensbedingungen im Pansen führten zur Entwicklung einer spezifischen Flora, deren Stoffwechselleistungen nicht nur Bakteriologen, sondern wegen ihrer Bedeutung für das Wirtstier auch Tierphysiologen beschäftigen. Dem hier vorgelegten Bericht gingen Untersuchungen voraus, die Beziehungen zwischen den im Pansen enthaltenen Bakterien und der Art des aufgenommenen Futters herstellen sollten (HELGWIG 1960). Die Ergebnisse ließen eine direkte Korrelation nicht erkennen. Die im Pansen auftretenden Säuren, die den ersten Gliedern der Fettsäurereihe angehören, werden bereits in der Pansenwand umgesetzt (PENNINGTON 1954, 1957; ANNISON u. PENNINGTON 1952, 1954) und fungieren als Stimulantien der Cellulosezer-setzer (BENTLEY 1954; BRYANT 1954; ALLISON 1958). Über ihre Verwertung durch Pansenbakterien ist noch wenig bekannt. Ob sie den im Pansen vorkommenden Bakterien als einzige C-Quelle dienen können, sollten vorliegende Versuche erweisen.

Die zweite Frage, deren Klärung angestrebt wurde, steht im Zusammenhang mit dem hohen CO_2 -Gehalt von Panseninhalt und -atmosphäre und seiner Auswirkung auf den Stoffwechsel der Pansenbewohner. HUHTANEN (1954) fand schon, daß aus dem Pansen isolierte Bakterienstämme in der Lage sind, $^{14}\text{CO}_2$ zu verwerten; eingehendere Untersuchungen über die Funktion des Kohlendioxyds wurden jedoch nicht angestellt. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die CO_2 -Abhängigkeit von Stoffwechselvorgängen ging ich der Frage nach, ob die an den hohen CO_2 -Partialdruck im Pansen angepaßten Bakterien auch zum Wachstum Kohlendioxyd benötigen; außerdem wurden sie morphologisch und physiologisch eingehend charakterisiert.

Methoden

Panseninhaltsproben wurden aus einer Fistel am dorsalen Teil des Schafpansens entnommen und sofort in einen sterilen mit CO_2 gefüllten Kolben überführt. Spätestens $\frac{1}{2}$ Std nach Entnahme wurden die Proben in die Anreicherungskulturen

geimpft. Die Isolierungen wurden in zwei Serien durchgeführt: 1. aus Pansen von Weidetieren, und 2. aus Pansen von Tieren, die ausschließlich mit Heu gefüttert wurden.

Für die Isolierungen, Übertragungen und Wachstumsversuche wurde als Grundmedium folgende Minerallösung benutzt: 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,005% CaCl_2 ; 0,5% NaCl ; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,001% EDTA (Titriplex III Merck). Diesem Medium, das in zehnfacher Konzentration bei -17°C aufbewahrt wurde, wurden als Stickstoffquelle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, als Vitaminquelle Hefeextrakt und als C-Quelle verschiedene organische Säuren in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Tab.1).

Tabelle 1. Zusammensetzung der Nährlösungen

Verwendung des Nährmediums	aerobe Bedingungen	anaerobe Bedingungen
Anreicherung	MM ¹ + 0,1% N + 0,1% C (PS, IBS, IVS)	MM + 0,1% N + 0,1% HE + 1,0% C (je 0,5% der Komponenten einer Kombination: ES-BTS; IBS-BTS; ES-Glyc; IBS-Glyc)
Isolierung	MM + 0,1% N + 0,05% HE + 0,1% C (PS, IBS, IVS)	wie Anreicherung
Regelmäßige Kultur der Stämme	MM + 0,1% N + 0,1% HE + 0,5% C (PS, IBS, IVS)	MM + 0,5% N + 0,1% HE + 1% bzw 2% C (BTS: 1%; Glyc: 2% + 2% Agar)
Reinheitsprüfung	MM + 0,5% Glucose + 0,5% Pepton + 0,05% HE	wie aerob
Probe der Anaerobiose		MM + 0,1% N + 0,1% HE + 0,5% C (Einzel- komponenten der Kom- binationen)

¹ MM = Mineralmedium; N = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; HE = Hefeextrakt; C = Kohlenstoffquelle; ES = Essigsäure; PS = Propionsäure; IBS = Isobuttersäure; IVS = Isovaleriansäure; BTS = Brenztraubensäure; Glyc = Glycerin.

Wachstumsteste und CO_2 -Fixierungsversuche wurden auf den gleichen Nährlösungen durchgeführt, auf denen die Stämme gehalten wurden.

Aerophile Bakterien wurden mit Hilfe von Verdünnungsausstrichen auf Agarplatten über mehrere Passagen gereinigt und auf Glucoseplatten auf Reinheit geprüft. Die Anaerobier wurden nach vier Passagen aus flüssiger Nährlösung mit

Hilfe des Mikromanipulators¹ als einzelne Zellen isoliert, unmittelbar danach in reduzierte Nährlösung überführt und sofort bei 37°C bebrütet.

Die Stämme wurden alle 4 Wochen auf Schrägagar-Röhrchen überimpft, bei 30 bzw. bei 37°C bebrütet und bei 10–12°C aufbewahrt. Die Anaerobenkulturen wurden mit dem Pyrogallolverschluß nach WRIGHT-BURRI verschlossen.

Zur systematischen Einordnung der isolierten Stämme wurden die nach BERGEY gebräuchlichen Bestimmungsnährböden verwendet. Zur Ermittlung der Wachstumskurve wurden je 50 ml angeimpfte Nährlösung in 300 ml-Erlenmeyerkolben

Tabelle 2. Verdünnungsreihe zur Prüfung der CO_2 -Abhängigkeit

Stufe	Verdünnung	ml Impf- lösung	Zellzahl je 5 ml Testmedium
1	—	0,1	10^8
2	1:10	0,1	10^7
3	1:100	0,1	10^6
4	1:1000	0,3	$3 \cdot 10^5$
5	1:1000	0,1	10^5
6	1:10000	0,3	$3 \cdot 10^4$
7	1:10000	0,1	10^4
8	1:100000	0,3	$3 \cdot 10^3$
9	1:100000	0,1	10^3
10	1:1000000	0,3	$3 \cdot 10^2$

geschüttelt. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die Bakterien-suspension durch Neigen des Kolbens in ein seitlich angeschmolzenes Reagensglas übergeführt, im Eppendorf-Photometer die Trübung gemessen und zur weiteren Kultivierung wieder mit der Gesamtsuspension im Kolben vereinigt. Die fakultativ Anaeroben wurden in diesem Falle mit Brenztraubensäure und auf Glucose-Pepton-Medium (Tab.1) lediglich unter aeroben Bedingungen auf ihre Wachstumsintensität geprüft.

Die Abhängigkeit des Bakterienwachstums vom CO_2 -Gehalt der Atmosphäre wurde in

50 ml Erlenmeyerkolben mit je 5 ml Substrat geprüft. Zur Kultivierung unter Ausschluß von Kohlendioxyd wurden Kolben mit Zentralgefäß, das 0,4 ml 25%ige KOH als Absorbens enthielt, benutzt; diese Kolben wurden mit einem Gummistopfen verschlossen. Für jeden Stamm und jedes Medium wurden Kölbchen mit abgestuften Impfmengen (mit zehn verschiedenen Stufen, jeweils in zwei Parallelen) angesetzt (Tab.2). Die 24stündige Vorkultur hatte eine Zellkonzentration von etwa 10^9 /ml.

Die Kulturen wurden mit und ohne CO_2 72 Std bei 30 bzw. 37°C geschüttelt und anschließend bonitiert. Bei den Anaeroben wurde zusätzlich CO_2 in den Gasraum der Kultur Röhrchen eingeleitet, um den Unterschied im CO_2 -Gehalt noch zu vergrößern.

Ergebnisse

a) Charakterisierung der Bakterienstämme

Unter den sich in den Anreicherungskulturen nach Tab.1 entwickelnden Formen ließen sich immer nur zwei bis drei, höchstens vier verschiedene morphologische Typen mikroskopisch unterscheiden. Ihre Zahl verringerte sich nach einigen Überimpfungen auf dem gleichen Nährmedium.

Die aeroben Bakterien ließen sich verhältnismäßig leicht rein kultivieren; nach mehreren Passagen über Agarplatten (in Tab.1 angegebene Kombinationen) erschienen sie mikroskopisch einheitlich. Die isolierten

¹ Herrn Prof. Dr. R. MEYER danke ich für seine Hilfe.

Stämme verloren regelmäßig ihre Wüchsigkeit; sie ließ sich jedoch durch Zusatz von 0,05% Hefeextrakt wiederherstellen. Im Laufe der Passagen waren die Vitaminreserven der Zellen offenbar aufgebraucht worden. Den Nährlösungen wurde daher routinemäßig 0,1% Hefeextrakt zugefügt.

Bei dem Versuch, Anaerobier zu isolieren, kamen von zehn Einzelkulturen von den fakultativen Stämmen nur drei, von den obligat Anaeroben nur einer zur Entwicklung. Um zu prüfen, ob sich ihr Verhalten gegenüber Sauerstoff im Laufe der Kultur ändert, wurden die

Tabelle 3. *Wachstum der isolierten anaeroben Stämme mit verschiedenen einzeln verabreichten C-Quellen*

Substrat	A 1		E 1		H 1	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob
Essigsäure	+	—				
Brenztraubensäure	+	+	+	+		
Isobuttersäure			+	—	—	—
Glycerin					—	+

Stämme A 1, E 1 und H 1 nach mehreren Passagen sowohl aerob als auch anaerob zunächst auf den in Tab. 1 angegebenen Kombinationen kultiviert. Die Stämme A 1 und E 1 wuchsen aerob und anaerob fast gleich gut; der Stamm H 1 nur anaerob. Da die Anreicherung in Nährlösungen erfolgte, die jeweils zwei Komponenten als C-Quelle kombiniert enthielten, war nun zu prüfen, ob die isolierten Organismen lediglich auf diesen zwei Substrate enthaltenden Nährböden wuchsen oder ob ein Substrat ausreicht; ferner war das Verhalten unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu prüfen. Die genannten Stämme wurden auf Nährlösungen mit jeweils einer der Komponenten aerob und anaerob kultiviert (Tab. 3). Die fakultativ anaeroben Stämme A 1 und E 1 wachsen auf Fettsäuren nur aerob, auf Brenztraubensäure sowohl aerob als auch anaerob. Der Stamm H 1 wächst auf Fettsäuren weder aerob noch anaerob und auf Glycerin nur anaerob; es handelt sich also um einen streng anaeroben Organismus. Weiterhin zeigen die Versuche mit einzeln verabreichten Substraten, daß die isolierten Organismen durchweg mit nur einem Substrat zu wachsen vermögen.

Die Ergebnisse der Wachstumsprüfung auf den Bestimmungsnährböden nach BERGEY sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Die aeroben und die anaeroben Stämme ähneln einander sehr stark. Mit Ausnahme der Stämme IVS-B und H 1 sind sie gramnegativ. Bei den aeroben Stämmen handelt es sich um Kurzstäbchen mit Abmessungen von $0,5 \cdot 1,0 \mu$ (Abb. 1 und 2). Die aeroben Pansenstämmen und der

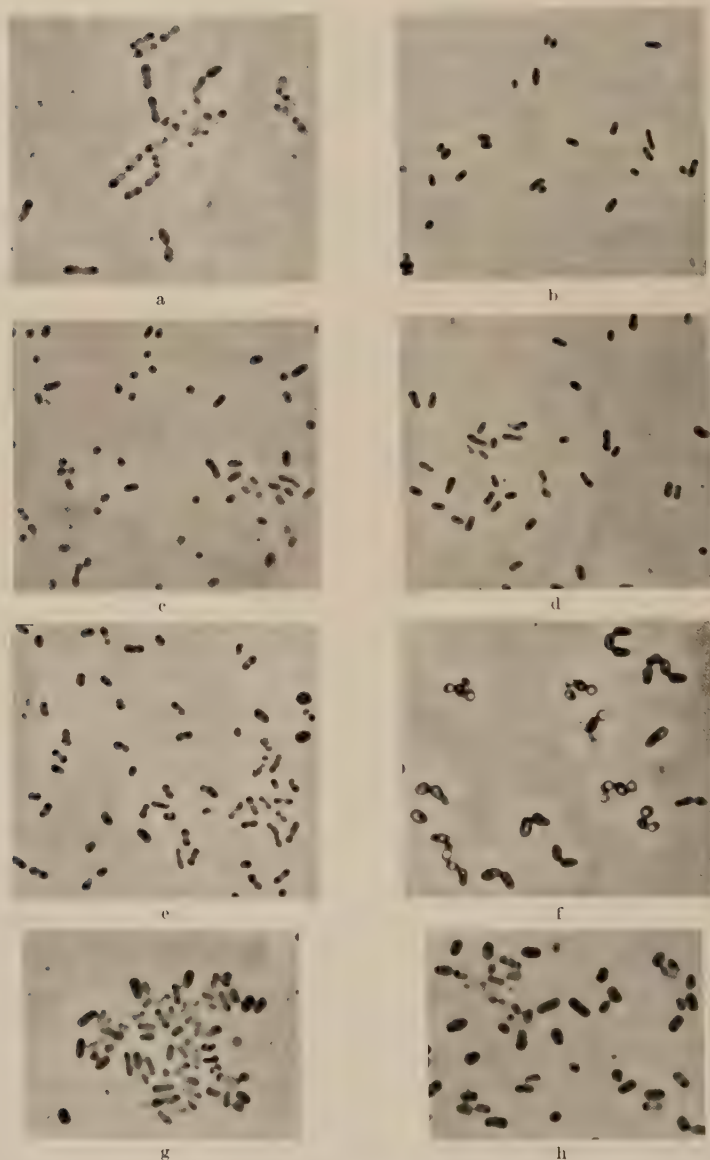


Abb.1. a *PSW* 0,50 · 1,10 μ ; b *PSB* 0,30 · 0,95 μ ; c *IBSH* 0,40 · 0,95 μ ; d *IBSW* 0,30 · 0,90 μ ; e *IFSW* 0,95 · 1,10 μ ; f *IVSB* 0,55 · 1,30 μ ; g *AI* 0,45 · 1,10 μ ; h *EI* 0,45 · 1,20 μ

Stamm *PS-B*, gehören wahrscheinlich (nach dem Bestimmungsschlüssel im Anhang von BERGEYS Bestimmungsbuch) zur Gattung *Achromobacter*. Sie werden dort als farblose Stäbchen beschrieben, die teils

beweglich, teils unbeweglich im Wasser oder im Boden vorkommen. Als unbewegliche Formen können unsere Stämme nur zu fünf beschriebenen *Achromobacter*-Arten gehören; jedoch wurde auf eine genaue Bestimmung der Stämme verzichtet.

Die Bestimmung der Stämme *A1* und *E1* führte zur Gattung *Bacteroides*. *Bacteroides*-Stämme mit einem Temperatur-Optimum von 37°C



Abb. 2. a *H1* auf 0,5% N. L. 0,35 · 2,3—3,3 μ Phako; b *H1* auf 2,0% N. L. 0,55 · 1,85—2,6 μ Phako; c *H1* auf 0,5% Agar 0,30 · 3,3—7,5 μ Gramfärbung; d *H1* auf 2,0% Agar 0,35 · 3,0—4,8 μ Phako

wurden schon häufig aus dem Pansen isoliert (zuletzt von BRYANT u. Mitarb. 1958). Sie sind in der Lage, unter anaeroben Bedingungen eine Reihe von Zuckern zu vergären und Säuren und Gase zu bilden; ferner bilden sie Indol aus Tryptophan; unter aeroben Bedingungen bilden beide Stämme Katalase.

Der streng anaerobe Stamm *H1* ließ sich nur schwer in das System einordnen; da er auf verschiedenen Nährböden und unter verschiedenen

Bedingungen in morphologisch voneinander abweichenden Formen auftritt. Die Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff erschwerte die Haltung dieses Stammes; er wurde auf MM-Agar mit 0,5% Ammonsulfat und 2% Glycerin gehalten. Es handelt sich um ein langes, nicht sporenbildendes Stäbchen, für das die Neigung zur Bildung längerer Ketten auf Agar-Nährböden und sein grampositives Verhalten charakteristisch ist. Die in Tab. 4 genannten Zucker wurden unter starker Säure- und Gasbildung vergoren; Stärke wurde abgebaut. Nach BERGEY ist er in die Gruppe der *Catena*-Bakterien in die Nähe von *Catenabacterium contortum* (PREVOT 1938) zu stellen. Auf Grund seines Vorkommens im Pansen und seiner etwas abweichenden Eigenschaften von der ebengenannten Art wird die Bezeichnung *Catenabacterium ruminantium* vorgeschlagen.

Tabelle 4. Physiologische Eigenschaften der isolierten Stämme

	PS-B	PS-W	IES-H	IES-W	IVS-W	A 1	E 1	H 1
Glucose	SG	SG	— —	S	S	SG	SG	SG
Lactose	S	SG	— —	— —	S	SG	SG	SG
Galaktose								SG
Maltose								SG
Mannose								SG
Laevulose								SG
Rohrzucker	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	SG
Acetoinbildung	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
Stärkeabbau	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	+
Gelatineverflüssigung	— —	— —	— —	— —	++	— —	— —	— —
H ₂ S-Bildung	— —	— —	— —	— —	— —	— —	—	+
Indolbildung	+	+	— —	— —	— —	+	+	— —
Nitratreduktion	+	+	— —	— —	— —	+	+	+
Katalasebildung	+	+	+	+	+	+	+	— —
Citratabbau	+	— —	+	— —	+	— —	— —	— —
Caseinabbau	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
Lackmusmilch	— —	S	— —	— —	SP	S	S	S

S = Säure; G = Gas; P = peptonisiert.

Zu weiteren Untersuchungen wurden außer den Pansenbakterien zwei aus Gartenboden isolierte Stämme herangezogen: Ein bereits 1956 aus dem Wurzelbereich von *Valeriana officinalis* auf Isovaleriansäure als C-Quelle isoliertes *Mycobacterium* (IVS-B) und ein aus Gartenerde auf Propionsäure isolierter Stamm (PS-B).

b) Das Wachstum

Für alle Stämme — mit Ausnahme von Stamm H 1 — wurden in dem Medium, auf dem sie isoliert worden waren, und auf einer Glucose-Pepton-Nährlösung die Wachstumskurven aufgenommen. Die Nährlösungen wurden mit einer 24stündigen Vorkultur beimpft und das

Wachstum durch Trübungsmessung anfänglich in stündlichen, später in größeren Abständen verfolgt. Aus Abb.3 und 4 geht hervor, daß alle Stämme verschieden lange Anlaufphasen unabhängig von der Bruttemperatur durchmachen. *A1* und *E1* verhalten sich sehr ähnlich; zusammen mit den geprüften physiologischen Merkmalen deutet diese Übereinstimmung im Wachstumsverlauf auf nahe verwandtschaftliche

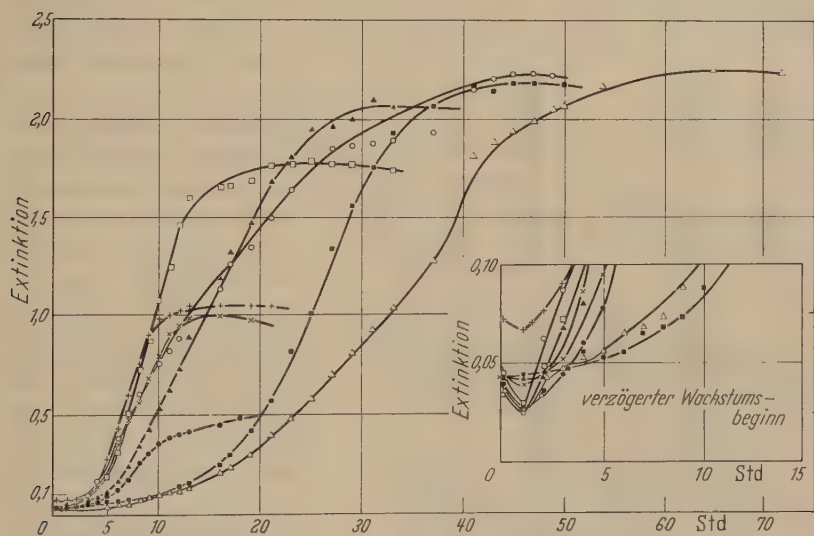


Abb.3. Wachstumskurven der isolierten Stämme auf ihren jeweiligen Säuremedien. ● *PS-B*; ○ *PS-W*; ▲ *IBS-H*; △ *IBS-W*; ■ *IVS-B*; □ *IVS-W*; + *A1*; × *E1*

Beziehung. Die Stämme mit den längsten Anlaufphasen haben sowohl auf Säuren als auch auf Glucose den größten Ertrag an Zellsubstanz (*IBS-H* und *IVS-B*). Bei einem Vergleich der Wachstumsintensitäten auf Säuren und auf Glucose zeigt sich die gleiche zeitliche Reihenfolge des logarithmischen Wachstumsbeginns. Aber der Ertrag liegt bei allen Stämmen auf Säuremedium höher als auf Glucose. Am stärksten tritt dieser Unterschied bei *IVS-W* hervor, der im Vergleich zu den anderen aeroben Stämmen am schnellsten wächst. Abgesehen vom geringen Ertrag an Zellsubstanz auf Glucose zeigt der Stamm *IBS-W* nach dem ersten Anstieg des Wachstums von der 9. bis zur 14. Std einen zweiten von der 19. bis zur 23. Std. Es ist anzunehmen, daß nach Verbrauch der Glucose das Pepton zusätzlich als C-Quelle fungiert und so den Bakterien die Möglichkeit zu einer zweiten Vermehrungsphase gibt. Die fakultativ anaeroben Stämme *A1* und *E1* wurden in diesem Test aerob geschüttelt, um sie mit den anderen aeroben Stämmen vergleichen zu können.

c) CO_2 -Abhängigkeit des Wachstums

Die Tatsache, daß die Stämme aus einem kohlendioxidreichen Milieu isoliert worden waren, gab Veranlassung zu prüfen, ob sie auch in synthetischen Nährlösungen Kohlendioxyd zum Wachstum benötigten. Da

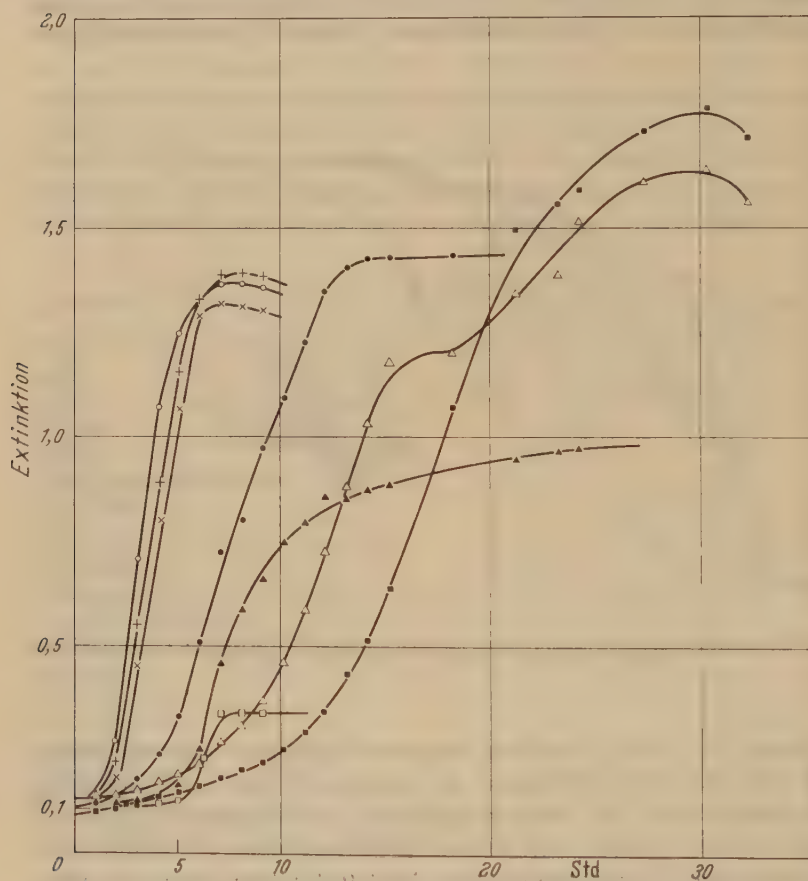


Abb.4. Wachstumskurven der isolierten Stämme auf Glucose-Peptone-Medium. • PS-B; ○ PS-W; △ IBS-W; ▲ IBS-H; ■ IVS-B; □ IVS-W; + AI; × E1

bereits tastende Versuche ergeben hatten, daß das Wachstum durch die Entziehung von Kohlendioxyd beeinträchtigt wurde und der Effekt von der Anzahl der eingepfachten Bakterien abhing, wurde eine Serie von Versuchen mit abgestuften Impfmengen angesetzt (Tab.2). Für jeden Stamm wurde die CO_2 -Abhängigkeit auf verschiedenen Substraten (IBS, PS, IVS und Glucose) geprüft. Nach einer Kulturdauer von 72 Std zu einem Zeitpunkt, an dem alle Stämme normalerweise am Ende ihres Wachstums angelangt waren, erfolgte die Bonitierung.

In der beigefügten Darstellung (Abb. 5) kommt die unterschiedliche Reaktion der untersuchten Stämme auf die Entziehung von Kohlendioxyd und die Abhängigkeit von den gereichten Substraten zum Ausdruck.

In den Gefäßen mit Kohlendioxyd (schwarze Säulen) kommen die meisten Stämme bei fast allen Verdünnungsstufen des Impfgutes zum Wachstum. In Gefäßen, in denen die Atmosphäre durch KOH im Mitteleinsatz CO_2 -arm gehalten wurde, erfolgt zwar bei starker Einsaat auch eine Entwicklung; in den höheren Verdünnungen wird das Wachstum jedoch unterdrückt.

Auf Glucose-Pepton reagieren die Stämme auf die Entziehung von CO_2 verschieden: *PS-B*, *PS-W* und *IBS-H* wachsen ohne CO_2 , *IBS-W*, *IVS-B* wenig und *IVS-W* überhaupt nicht. Auf Glucose- NH_4 wachsen die IBS-Stämme nicht, *IVS-W* schwach, *IVS-B* und die *PS*-Stämme gut. Diese Ergebnisse bestätigen die Wachstumsmessungen insofern, als sie erkennen lassen, daß die isolierten Pansenbakterien Spezialisten für organische Säuren als C-Quelle sind. Bei den fakultativ anaeroben Stämmen *A1* und *E1* sowie dem obligaten *H1*-Stamm war unter anaeroben Bedingungen keine besondere CO_2 -Abhängigkeit zu erkennen.

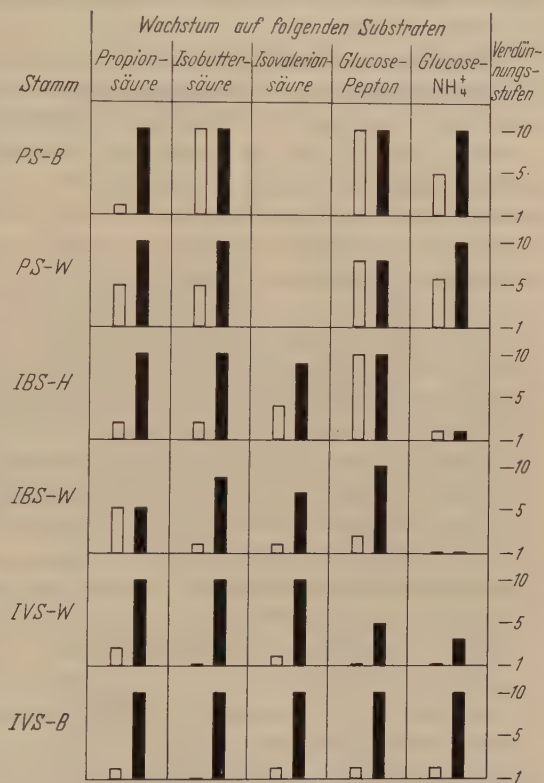


Abb. 5. Beeinflussung des Wachstums der isolierten Stämme durch die Entziehung von Kohlendioxyd. Schwarze Säulen: mit CO_2 , Weiße Säulen: ohne CO_2 .

Diskussion

Die Einordnung von isolierten Pansenbakterien in ein allgemeines System, wie es in BERGEYS Manual of Bacteriology vorliegt, bietet wegen der Besonderheit ihrer Herkunft gewisse Schwierigkeiten. Die Zugehörigkeit der fakultativen Stämme *A1* und *E1* zur *Bacteroides*-

Gruppe erscheint sicher, da sie in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften dieser Gruppe sehr nahe stehen und außerdem mit den von BRYANT (1954) aus Pansen isolierten *Bacteroides*-Stämmen in den Hauptmerkmalen übereinstimmen. Daß sie im Pansen in großer Zahl vorkommen und demzufolge eine wichtige Funktion zu erfüllen haben, wurde von BRYANT eingehend geschildert und läßt sich experimentell bestätigen.

Schwieriger ist die Bestimmung des obligat anaeroben Stammes *H 1*, der in künstlicher Kultur nicht nur sehr schwer zu halten ist, sondern auch auf den verschiedenen Nährmedien morphologisch unterschiedlich erscheint (Abb. 2). Die systematische Stellung dieses Stammes zu bestimmen, ist nur möglich, wenn man die verschiedenen Erscheinungsformen kennt und diejenige, welche am häufigsten auftritt, als die „normale“ anspricht. In diesem Fall scheint die in Abb. 2a dargestellte Form für Nährlösung als Substrat die „normale“ zu sein. Die Eigenschaft, auf Agar sehr lange Ketten mit langen Zellen zu bilden, ist auch bei anderen Bakterienarten schon beschrieben worden. Bemerkenswert ist jedoch, daß der Stamm als Langstäbchen grampositiv reagiert, dazu streng anaerob wächst und durch geringe Spuren von Sauerstoff bereits in seinem Wachstum gehemmt wird. Alle diese Eigenschaften gehören nach BERGEYS Bestimmungsschlüssel zur Gattung *Catenabacterium*, die von PREVOT (1938) erstmalig beschrieben wurde. Er hat diese Organismengruppe lediglich nach ihrer Kettenbildung benannt; im übrigen scheint diese Gruppe aber sehr heterogen zusammengesetzt zu sein. Über Herkunft und Standort kann nach PREVOT nicht viel ausgesagt werden. Es muß sich bei Stamm *H 1* um eine neue Art der Gattung *Catenabacterium* handeln, die im Pansen ihren Standort hat — vorausgesetzt, daß er ein „echter“ Pansenbewohner ist — und für die deshalb die Bezeichnung *Catenabacterium ruminantium* vorgeschlagen wird. Die aeroben Stämme ließen sich verhältnismäßig leicht bestimmen, da ihre Hauptmerkmale auf die Gattung *Achromobacter* hindeuten. Die zu ihr gehörenden Arten sind gewöhnliche Bodenbewohner, die im vorliegenden Falle höchstwahrscheinlich mit Futter in den Pansen gelangt sind.

Das Vorkommen von aeroben Bakterien im Pansen läßt die Frage nach ihrer Bedeutung innerhalb dieses Standortes auftauchen. Normalerweise herrschen im Pansen anaerobe Bedingungen, die für aerobe Organismen denkbar ungünstig sind. Die Frage, ob sie sich dort vermehren und aktiv an den Stoffwechselvorgängen teilnehmen oder nur Passanten sind, die dem Wirtstier lediglich als zusätzliche Nahrungsquelle dienen, läßt sich nach den vorliegenden Untersuchungen nicht beantworten. Daß sie organische Säuren besonders gut als C-Quelle verwerten können und unter erhöhtem CO₂-Druck besser wachsen, deutet auf ihre Fähigkeit hin, sich den gegebenen Bedingungen anzupassen.

In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, ob es im Pansen Bakterien gibt, die zwei verschiedene C-Verbindungen — eine reduzierte und eine oxydierte — nach Art einer Dismutation verwerten können. Da oxydierte und reduzierte Substanzen im Pansen gleichermaßen vorkommen, wäre die Möglichkeit durchaus denkbar. Anhaltspunkte dafür konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht gefunden werden; denn die auf Kombinationen isolierten und anfänglich kultivierten Stämme *A1*, *E1* und *H1* wuchsen später auch auf einer Einzelkomponente und zwar unter anaeroben Bedingungen auf einer oxydierten und, falls sie fakultativ anaerob waren, unter aeroben Bedingungen auch auf einer reduzierten Verbindung.

Die Lösung der Frage, wie sich die aeroben Stämme gegenüber erhöhtem CO_2 -Partialdruck verhalten, ist weiteren quantitativen Untersuchungen vorbehalten.

Zusammenfassung

Aus Schafpansen wurden sechs aerobe, zwei fakultativ anaerobe Bakterienstämme und ein obligat anaerober Stamm isoliert und morphologisch und physiologisch charakterisiert. Auf Säuren und Glucose-Pepton enthaltenden Nährlösungen wurde der Wachstumsverlauf und die Abhängigkeit des Wachstums vom CO_2 -Gehalt der Atmosphäre untersucht. Das Ausmaß der durch CO_2 -Entzug bedingten Wachstums-
hemmung ist vom Nährboden und von der Zahl der eingimpften Zellen abhängig.

Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Herrn Professor Dr. H. G. SCHLEGEL danke ich für sein stets gleichbleibendes Interesse und viele Anregungen.

Literatur

- ALLISON, M. J., M. P. BRYANT and R. N. DOETSCH: *Science* **128**, 474—475 (1958).
ANNISON, E. F., and R. J. PENNINGTON: *Biochem. J.* **52**, IX (1952).
ANNISON, E. F., and R. J. PENNINGTON: *Biochem. J.* **57**, 685—692 (1954).
BENTLEY, O. G.: *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5000 (1954).
BERGEY, O. H.: *Manual of Determinative Bacteriology*. London 1948.
BRYANT, M. P.: *Science* **120**, 944—945 (1954).
BRYANT, M. P., N. SMALL, C. BOUMA and H. CHU: *J. Bact.* **76**, 15—23 (1958).
HUHTANEN, C. N., F. J. CARLETON and H. R. ROBERTS: *J. Bact.* **68**, 749—751 (1954).
HELWIG, R.: *Z. Tierphysiol. Tierernähr.* **15**, 127—135 (1960).
PENNINGTON, R. J.: *Biochem. J.* **56**, 410—416 (1954).
PENNINGTON, R. J.: *Biochem. J.* **65**, 109—111 (1957).
PREVOT: *Ann. Inst. Pasteur* **60**, 294 (1938).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Radioaktivitätsmessung an Einzellern auf Membranfiltern

Von

H. G. SCHLEGEL und R. LAFFERTY

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. September 1960)

Zur Bestimmung der Radioaktivität von einzelligen Mikroorganismen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit radioaktiven Substraten wird der Stoffwechselvorgang gewöhnlich durch Zusetzen von Eiweiß-fällungsmitteln oder Giften abgestoppt, und die Suspension wird nach den üblichen Methoden in dünner Schicht zur Zählung gebracht (ORMEROD 1953). Bei diesen Verfahren sind jedoch einige Voraussetzungen nicht erfüllt, die bei routinemäßigen Bestimmungen zur Erfassung der Kinetik der Aufnahme radioaktiver Substanzen in Mikroorganismen gegeben sein müssen. Wir strebten ein Verfahren an, das folgenden Anforderungen Rechnung trägt: 1. Der Zellstoffwechsel soll möglichst schlagartig gestoppt werden. 2. Ein Zusatz von häufig zur Sistierung von Stoffwechselabläufen verwendeten Lösungen (Säuren, Alkohol, Giften, Schwermetallsalzen) soll vermieden werden, um die Permeabilitäts-verhältnisse der Zellgrenzschichten nicht zu verändern und lösliche radioaktiv markierte Zellbestandteile nicht durch Auswaschen zu verlieren; bei kurzen Versuchszeiten ist der prozentuale Anteil der löslichen Fraktion an der Gesamtaktivität der Zellen außerordentlich hoch (KORNBERG 1958). 3. Die suspendierten Zellen sollen homogen und in geometrisch definierter Position auf einer Unterlage niedergeschlagen werden, die zur Bestimmung der Radioaktivität mit einem Endfenster-zählrohr in geeigneter Weise montiert werden kann. 4. Hohe Präzision soll sich mit geringem Arbeitsaufwand verbinden, um die für kinetische Messungen nötige Vielzahl von Proben routinemäßig rasch aufarbeiten zu können.

Unter den beschriebenen Verfahren kann die Filtrationstechnik (HENRIQUES u. Mitarb. 1946), die als Bariumcarbonatmethode zur ^{14}C -Bestimmung vielfach angewendet wird (CALVIN, HEIDELBERGER, REID, TOLBERT u. YANKEWICH 1949; SAKAMI 1957; ORMEROD 1956), in geeigneter Abwandlung den genannten Anforderungen gerecht werden. Wir verwenden das Glasfiltergerät 96 v (Schott & Gen., Mainz), benutzen aber anstelle des Glasaufsatzes einen Zylinder aus V2A-Stahl (Abb. 1), dessen äußerer Durchmesser im unteren Teil dem der Glasfritte gleicht und dessen Lumen einen Querschnitt von $3,00\text{ cm}^2$ hat. Da keines der

gebräuchlichen Papierfilter Bakterien quantitativ zurückzuhalten vermag, bedienen wir uns Göttinger Membranfilter (Gr. 6, 35 mm \varnothing); (STRÜVEN 1960). Da das Membranfilter auf der Fritte nicht völlig abdichtet, unterlegen wir es mit einem Papierfilter (Schl. & Sch. Nr. 597).

Nach Auflegen der Filter und Aufsetzen des Oberteils werden Ober- und Unterteil zur Abdichtung mit einem dicht schließenden Gummiring umgeben. In die fertig montierte Apparatur wird auf das Membranfilter eine kleine Menge fein zerstoßenen Eises gebracht, die jeweils

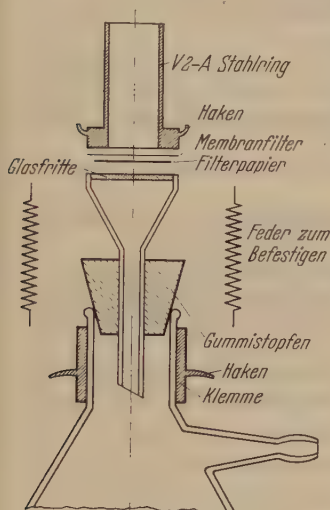


Abb. 1. Filtrationseinrichtung zur Herstellung dünner Schichten von radioaktiv markierten Mikroorganismen oder Fällungen auf Membran- oder Papierfiltern

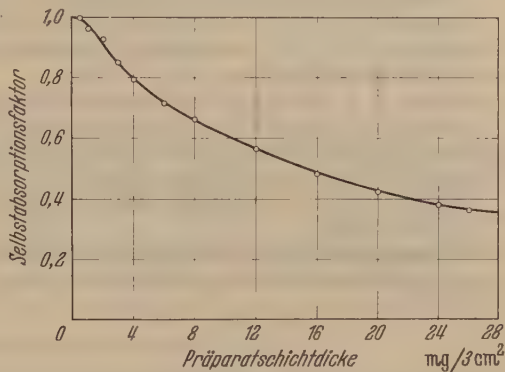


Abb. 2. Korrektionskurve für die Selbstabsorption von Bakterien-Niederschlägen auf Membranfiltern. Mit ^{14}C markierte Mycobakterien wurden mit Hilfe der Filtrationseinrichtung auf Göttinger Membranfilter niedergeschlagen; die Korrektionskurve wurde nach der Methode von YANKWICH u. Mitarb. (1947) aufgestellt

so bemessen wird, daß die in Form einer Suspension zugesetzte Probe unter vollständigem Schmelzen des Eises auf den Gefrierpunkt abgekühlt wird (z.B. 0,33 g Eis von -10°C je 1 ml Suspension von 30°C). Die Suspension wird aus dem Versuchsgefäß mit einer Injektionsspritze überführt. Nach vollkommenem Schmelzen des Eises, das bei Verwendung von methylenblaufärbtem Eis besonders leicht zu erkennen ist, wird abgesaugt, mit dest. Wasser nachgewaschen und trockengesaugt. Das noch feuchte Membranfilter wird gemeinsam mit dem untergelegten Papierfilter in der üblichen Weise auf einer Messingunterlage mit einem Spannungsring befestigt und nach völliger Trocknung zur Zählung gebracht (FH 49 mit Probenwechsler).

Bei Versuchen mit Mycobakterien, *Achromobacter*- und *Pseudomonas*-Arten brauchte bis zu einer Belegung des Filters mit 1 mg Bakterien (Trockengewicht/3 cm²) die Selbstabsorption nicht berücksichtigt zu werden. Für größere Schichtdicken ergab sich die angegebene Korrektionskurve für die Selbstabsorption (Abb. 2).

Zusammenfassung

Zur Radioaktivitätsmessung von einzelligen Mikroorganismen wird ein Verfahren unter Verwendung von Membranfiltern beschrieben. Die Korrektionskurve für die Selbstabsorption wird angegeben.

Literatur

- CALVIN, M., C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT and P. E. YANKWICH: Isotopic Carbon. New York: Wiley 1949.
- HENRIQUES, F. D., G. B. KISTIAKOWSKY, C. MARGUETTI and W. G. SCHNEIDER: Analytical procedure for measurement of long-lived radioactive sulfur, S^{35} , with a Lauritzen Electroscope and comparison of Electroscope with special Geiger counter. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **18**, 349 (1946).
- KOENBERG, H. L.: The metabolism of C_2 -compounds in microorganisms. Biochem. J. **68**, 535—542 (1958).
- ORMEROD, J. G.: The use of carbon dioxide in the measurement of carbon dioxide fixation in *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. **64**, 373—380 (1956).
- SAKAMI, W.: Handbook of Isotope Tracer Methods. Cleveland 1955.
- STÜVEN, K.: Beiträge zur Kenntnis der CO_2 - und Lactatassimilation von *Desulfovibrio aestuarii* (van Delden) Kluyver und van Niel. Arch. Mikrobiol. **36**, 31—45 (1960).
- YANKWICH, P. E., T. H. NORRIS and J. L. HUSTON: Correcting for the absorption of weak Beta-particles in thick samples. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **19**, 493 (1947).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Quantitative Messungen über den CO₂-Einbau an organotrophen Bakterien

Von

H. G. SCHLEGEL, R. LAFFERTY und R. STELLMACH-HELWIG

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. September 1960)

Die Entziehung von Kohlendioxyd beeinträchtigt und unterbindet das Wachstum vieler Bakterien (GLADSTONE, FILDES u. RICHARDSON 1935) und beeinflusst auch den Stoffwechsel „ruhender“, nicht wachsender Zellen (HES 1938; GEST u. STOKES 1952; HARRIS 1954; SCHLEGEL 1955a u. b). Fragen der heterotrophen CO₂-Fixierung wurden unter Betonung der biologischen Aspekte bereits früher von KLUYVER (1939) und VAN NIEL u. Mitarb. (1942) zusammenfassend dargestellt.

Die Beobachtungen über die durch die Entziehung von CO₂ bewirkten Veränderungen im Stoffwechsel einiger Mikroorganismen lassen noch keine Aussage über die Rolle des Kohlendioxyds im Stoffwechsel zu. Ob dem Kohlendioxyd lediglich eine katalytische Funktion zukommt oder ob es in Substratmengen fixiert und in die Zellsubstanz eingebaut wird, bleibt ungewiß.

Zahlreiche Arbeiten haben erwiesen, daß Kohlendioxyd von einer Vielzahl von heterotrophen Organismen fixiert wird (SLADE u. Mitarb. 1942; LYNCH u. CALVIN 1952; HUHTANEN, CARLETON u. ROBERTS 1954; WIAME u. BOURGEOIS 1955). Quantitative Untersuchungen über den CO₂-Einbau liegen jedoch nur in geringer Zahl vor (MCLEAN, ROBINSON u. PURDIE 1951; MCLEAN u. PURDIE 1952, 1955; ABELSON, BOLTON u. ALDOUS 1952). Durch die vorliegenden Versuche wollten wir zu einer Vorstellung von der Größenordnung gelangen, mit der Kohlendioxyd bei der oxydativen Assimilation organotropher Bakterien in die Zelle eingebaut wird.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Stoffwechsel von Bakterien, die aus dem Schafpansen isoliert worden waren, wurden zunächst einige Isovaleriansäure, Isobuttersäure und Propionsäure oxydierende Bakterienstämme untersucht; vergleichsweise wurden *Acetobacter*-Arten, *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* in die Untersuchung einbezogen.

I. Organismen, Kulturverfahren, Methoden

a) Organismen

Zu den Versuchen wurden Arten und Stämme herangezogen, die aus Sammlungen stammten oder neu isoliert worden waren. Sammlungsstämme: *Escherichia coli* K-12, *Y mel*⁻, *E. coli* B, *Serratia marcescens* (Institutssammlung); *Acetobacter lovaniense*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter rancens*, *A. suboxydans*¹. *Acetobacter aceti* und *A. xylinum* wurden von Buchenholzspänen eines Essiggenerators isoliert. Die Stämme IVS-W, IBS-H, IBS-W und PS-W wurden aus Panseninhalt isoliert und nach der als Substrat der Anreicherung verwendeten Kohlenstoffquelle² und der Herkunft benannt (STELLMACH-HELWIG 1961). Bei IVS-B handelt es sich um ein bereits 1956 aus Erdboden isoliertes *Mycobacterium*. Stamm PS-B wurde aus Gartenerde auf Propionsäure angereichert und isoliert. (Die Herkunft der Stämme wird durch folgende Symbole angegeben: B = Boden; W = Pansen nach Weidefütterung; H = Pansen nach Heufütterung.)

b) Kulturverfahren

Sämtliche Stämme wurden auf flüssigen Nährböden herangezogen. Für die säureverwertenden Pansen- und Bodenstämme enthielt die Grundnährlösung 0,1% KH_2PO_4 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,005% CaCl_2 ; 0,5% NaCl ; 0,001% Äthylendiamintetraessigsäure; 0,01% Hefeextrakt; 0,5% Fettsäure. Die Essigsäurebakterien wurden auf 0,5% Hefeextrakt + 2% Äthanol, *E. coli* auf einem Mineralmedium mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Glucose, *Serratia marcescens* auf Glucose-Pepton kultiviert. 125 ml Nährlösung in 1 l-Erlenmeyerkolben wurden mit vorkultivierten Zellen (1:10) beimpft und bei 28 bzw. 37°C, 15–20 Std unter Schütteln bebrütet. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet, zweimal gewaschen, in einer Minerallösung suspendiert und zur Entfernung von möglicherweise vorhandenen Klumpen durch eine Fritte G 2 filtriert. Die Dichte der Suspension war so bemessen, daß die O_2 -Aufnahme nicht durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Luftsauerstoffs begrenzt wurde.

c) Messung des Gaswechsels

Zur manometrischen Messung der O_2 -Aufnahme in der Warburg-Apparatur in Gegenwart und Abwesenheit von Kohlendioxyd dienten Gefäßtypen mit verschiedenen gestalteten Absorptionseinsätzen: I. Zweiarmige Gefäße mit Zentraleinsatz, II. Gefäße mit hängendem Einsatz (nach WARBURG), III. Gefäße mit kelchförmigem Einsatz, IV. Gefäße mit hochangesetzter Galerie³. Die CO_2 -Absorptionseinsätze enthielten 0,2 ml KOH ohne Papier. Zur Messung in Gegenwart von CO_2 diente Pardee-Puffer (PARDEE 1949; KREBS 1953), der sich mit 1,0% CO_2 -Luft-Gemisch im Gleichgewicht befand. Inkubiert wurde in der Rundwarburgapparatur (Modell V, der Fa. Braun/Melsungen) bei 30 bzw. 37°C, 60 U/min, 3 cm Amplitude.

d) Quantitative Messung des CO_2 -Einbaus

Zur Erfassung der CO_2 -Aufnahme wurden Suspensionen, die mit den für die Atmungsmessungen benutzten identisch waren, in 200 ml-Erlenmeyerkolben im Wasserbad geschüttelt. Die Kolben waren mit Gummistopfen verschlossen und mit

¹ Für die Überlassung dieser Essigsäurebakterien danken wir Herrn Prof. TH. WIKÉN.

² Folgende Abkürzungen werden verwendet: IVS = Isovaleriansäure; IBS = Isobuttersäure; PS = Propionsäure.

³ Gefäßtypen II, III u. IV wurden von der Fa. Braun/Melsungen angefertigt und uns zur Erprobung überlassen.

einem Aufsatz ausgestattet, aus dem nach Äquilibration Substrat und radioaktive Bicarbonatlösung zugekippt wurde; zu 20 ml Suspension [0,2–2 mg Bakterien (Tr.-Gew.)/ml] wurden 25 μMole Substrat und 150 μMole $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (etwa $2 \cdot 10^5$ Imp/min) zugefügt. Durch eine am Erlenmeyerkolben seitlich angebrachte mit Gummistopfen und Injektionsnadel verschlossene Öffnung wurden in Abständen von 10–30 min Proben von 2 ml entnommen, auf Membranfiltern (Gr. 6) abgesaugt (SCHLEGEL u. LAFFERTY 1961), mit 0,1 n HCl gewaschen, auf Messingunterlagen montiert und luftgetrocknet.

Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgte mit dem Strahlungsmeßgerät FH 49 mit Probenwechsler und Zeitdrucker der Fa. Frieske u. Höpfner. Für jede Probe wurden so viele Impulse gezählt, daß der wahrscheinliche Fehler unter 2% blieb. Korrekturen für Selbstabsorption und Totzeit wurden berücksichtigt.

Die radioaktive Bicarbonatlösung wurde durch Konvertierung von $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ in $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ hergestellt und als 0,1 molare Lösung in 0,001 n NaOH vorrätig gehalten (1350 Imp/min/ μMol NaHCO_3). Die Impulszahl wurde unter denselben Bedingungen bestimmt und auf unendlich dünne Schicht korrigiert.

II. Beeinflussung der O_2 -Aufnahme durch Entziehung von Kohlendioxyd

a) Modellversuche

Zur Erfassung der Geschwindigkeit, mit der im Hauptraum der Warburggefäße entwickeltes Kohlendioxyd durch das in verschieden gestalteten Einsätzen vorhandene Alkali reabsorbiert wird, wurden einige

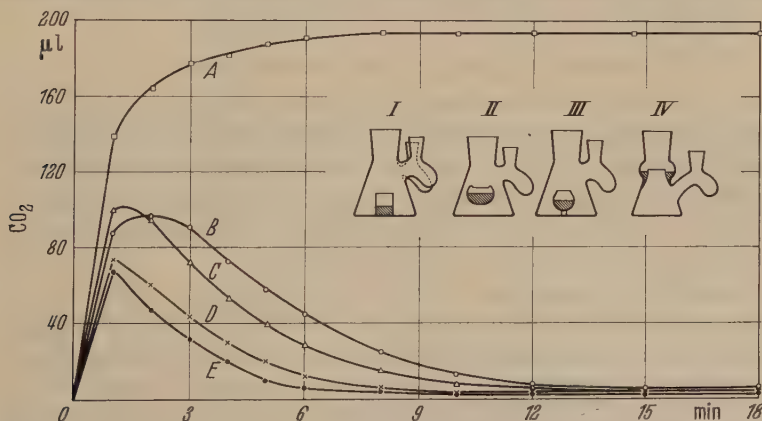


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der CO_2 -Absorption durch Kalilauge in verschieden gestalteten Gefäßen bei 30° C. Hauptraum: 1 ml H_2O + 1,2 ml Na_2CO_3 -Lösung; Seitenarm: 0,2 ml 1 n H_2SO_4 ; Absorptionseinsatz 0,2 ml 20% KOH. Zur Zeit 0 wurde die Säure durch Kippen in den Hauptraum herübergeholt und in Minutenintervallen abgelesen. Kurve A: Gefäß I ohne KOH; Kurve B: Gefäß I mit KOH im Zentralgefäß; Kurve C: Gefäß III mit KOH im Kelcheinsatz; Kurve D: Gefäß IV mit KOH in hochangesehter Galerie; Kurve E: Gefäß II mit KOH im hängenden Einsatz

Modellversuche angestellt. Der Hauptraum wurde mit einer Na_2CO_3 -Lösung und jeweils ein Seitenarm mit 0,2 ml 1 n H_2SO_4 beschickt; die Absorptionseinsätze enthielten 0,2 ml 20% KOH. Papiereinlagen wurden nicht verwendet. Nach Einstellung des Temperaturgleichgewichtes wurde Säure aus dem Seitenarm in den Hauptraum herübergeholt (Abb. 1). Während in Vergleichsgefäßen, die kein Alkali enthielten, CO_2

ausgetrieben wird, wird das Kohlendioxyd in KOH enthaltenden Gefäßen mit verschiedenen Geschwindigkeiten zurückabsorbiert (WARBURG u. KRIPPAHL 1958). In allen Fällen erfolgt in den Gefäßen mit hängenden Einsätzen (II) die rascheste Reabsorption; sie ist nach 8 min bereits abgeschlossen. In den Gefäßen mit hochangesetzter Galerie (IV) geht die Reabsorption ebenfalls zunächst rasch vor sich; jedoch nähert sich der CO_2 -Druck dem Null-Wert asymptotisch und erreicht ihn erst nach etwa 15 min. Dieses Gefäß ist dem mit Kelcheinsatz (III) überlegen. In dem normalen zweiarmigen Gefäß (I) erfolgt die Reabsorption am langsamsten.

Weitere, in der graphischen Darstellung nicht belegte Versuche zeigen, daß die Geschwindigkeit der CO_2 -Absorption in Warburggefäßen im wesentlichen von drei Faktoren abhängt:

1. Von der Entfernung der CO_2 abgebenden Oberfläche bis zum Kohlendioxyd absorbierenden Agens, 2. von der Größe der absorbierenden Oberfläche, 3. von der Erneuerung der absorbierenden Oberfläche. Die Erneuerung der Oberfläche erfolgt bei Gefäß II (mit hängendem Einsatz) durch Teilnahme an den Schüttelbewegungen; ähnlich stark ist die Schüttelbewegung der KOH-Lösung im Kelchgefäß (III) und dem mit hochangesetzter Galerie (IV).

b) Beeinflussung der Substratatmung

Versuche über die Beeinflussung der Substratatmung durch die Entziehung von Kohlendioxyd wurden mit Stamm *IVS-W* angestellt, der sich in Wachstumsversuchen als besonders CO_2 -abhängig erwiesen hatte. Die Gefäße wurden mit Bakteriensuspension, Substrat (Isovaleriansäure) und KOH bzw. Pardee-Puffer beschickt; die CO_2 -gepufferten Ansätze wurden mit 1% CO_2 enthaltender Luft durchströmt.

Der Verlauf der Atmungskurven (Abb. 2) macht deutlich, daß die Entziehung von Kohlendioxyd zu ausgeprägten Effekten führt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen verlief die Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von Kohlendioxyd (Kurve A) am raschesten. In allen Fällen, bei denen die Atmosphäre durch Absorption des Kohlendioxyds CO_2 -arm gehalten wurde, kam es zu einer mehr oder weniger großen Hemmung der Substratatmung. Der Effekt ist um so stärker, je günstiger die Absorptionseigenschaften des CO_2 -Absorptionseinsatzes sind. Am wirksamsten wird die Atmung in dem Gefäß mit hängendem Absorptionseinsatz beeinträchtigt (Kurve F); die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme beträgt hier nur etwa 15% von der des ungehemmten Ansatzes (A). In den Gefäßen mit anders gestalteten Absorptionseinsätzen tritt die Hemmwirkung nur abgeschwächt in Erscheinung.

Das Ausmaß der Atmungshemmung hängt davon ab, in welchem Maße den atmenden Zellen das Kohlendioxyd entzogen wird. Die Konzentration des Kohlendioxyds im Suspensionsmedium ergibt sich aus der Differenz der Geschwindigkeiten

der CO_2 -Produktion durch die Zellen einerseits und der Absorption durch die Kalilauge andererseits. Der Effekt ist also eine Funktion der Suspensionsdichte und der Stoffwechselaktivität der Zellen; er tritt nur bei relativ dünnen Suspensionen ausgeprägt in Erscheinung. Überschreitet die CO_2 -Produktion der Suspension eine bestimmte Schwelle, so bleibt selbst bei günstig gestalteten Gefäßen der CO_2 -Partialdruck im Suspensionsmedium noch so hoch, daß Kohlendioxyd als Stoffwechselfaktor nicht ins Minimum gerät. Sollen also verschiedene Mikroorganismen und verschiedene Substrate bezüglich der Atmungshemmung durch CO_2 -Entziehung verglichen werden, so müßte zunächst dafür gesorgt werden, daß die CO_2 -Produktion durch die Zellen bei allen Versuchsansätzen (mit Pardee-Puffer gleich

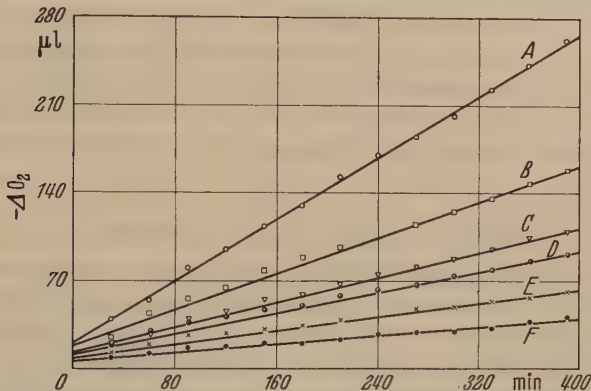


Abb. 2. Sauerstoffaufnahme CO_2 -bedürftiger Bakterien (Stamm IVS-W) in Gefäßen mit Pardee-Puffer bzw. KOH in verschieden gestalteten CO_2 -Absorptionseinsätzen. Bakteriensuspension (0,74 mg Trockengewicht) in Grundmineralmedium mit 100 μMol IVS + 15 μMol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 7,0; die CO_2 -Absorptionseinsätze enthielten 0,2 ml 20% KOH bzw. 0,6 ml Pardee-Puffer (im Gleichgewicht mit 1% CO_2 in Luft). Kurve A: Gefäße II und III mit Pardee-Puffer; Kurve B: Gefäß I mit KOH im Seitenarm; Kurve C: Gefäß IV mit KOH in hochangesehter Galerie; Kurve D: Gefäß I mit KOH im Zentraleinsatz; Kurve E: Gefäß III mit KOH im Kelcheinsatz; Kurve F: Gefäß II mit KOH im hängenden Einsatz

ist. Auf die Absorptionsrate des Kohlendioxyds durch die Kalilauge haben mehrere Faktoren Einfluß: Form des Absorptionseinsatzes (Größe und Erneuerung der absorbierenden Oberfläche), Gas- und Flüssigkeitsvolumina, Entfernung zwischen CO_2 -absorbierender und CO_2 -entwickelnder Oberfläche, Geschwindigkeit des Schüttelns, Temperatur, pH . Es leuchtet ein, daß sich alle durch die Entziehung von Kohlendioxyd bewirkten Veränderungen des Stoffwechsels nur bei genauer Kenntnis und Einhaltung der Versuchsbedingungen reproduzieren lassen.

Die Möglichkeit zum Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von HARRIS (1954) sind nur beschränkt. HARRIS gibt die O_2 -Aufnahme während der Oxydation von Glucose an. Legt man einen RQ von 1 zugrunde, so entsprechen die Werte denen für die CO_2 -Bildung. In der von HARRIS wiedergegebenen Tabelle variieren die für verschiedene Organismen gemessenen Werte für die O_2 -Aufnahme zwischen 29 und 185 μl $\text{O}_2/2$ Std. Die Versuchsbedingungen sind also für die einzelnen Organismen recht verschieden gewesen. Große Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme zwischen den Versuchsbedingungen + und $-\text{CO}_2$ treten im wesentlichen bei Arten mit geringem Gaswechsel auf (*Rhizobium leguminosarum*, *Rh. trifolii*). Bei Arten mit hohem Gaswechsel (*Azotobacter chroococcum*: 185 μl $\text{O}_2/2$ Std) ist der Unterschied in der Gasaufnahme nur gering.

Bei der Prüfung des Stammes *IVS-W* (Abb.2) hatten wir die Suspensionsdichte so gewählt, daß die O_2 -Aufnahme in den von HARRIS gewählten Bereich fiel ($74 \mu l O_2/2$ Std). Wurde den Zellen CO_2 durch Kalilauge im Zentraleinsatz entzogen (Kurve D), so wurden nur $25 \mu l O_2/2$ Std aufgenommen. In Gegenwart von 1% Kohlendioxyd (mit Pardee-Puffer) wurden demnach 200% mehr Sauerstoff aufgenommen als bei Entziehung des Kohlendioxyds durch KOH im Zentralgefäß. Vergleicht man das Gefäß mit hängendem Einsatz (Kurve F), so errechnet sich ein Zuwachs von 640% .

Dieser der CO_2 -Wirkung zuzuschreibende vergleichsweise große Unterschied in der O_2 -Aufnahme deutet darauf hin, daß Kohlendioxyd auf die Oxydation von Isovaleriansäure durch den Stamm *IVS-W* Einfluß nimmt und daß der beobachtete Effekt den von HARRIS (1954) und CHAIX, LORTHIOIS u. ISSALY (1958) mitgeteilten größten CO_2 -Wirkungen vergleichbar ist.

III. Einbau von radioaktivem Kohlendioxyd

Die CO_2 -Fixierung führt bei heterotrophen Organismen nur selten zu einer Vermehrung des organisch gebundenen Kohlenstoffs. Betrachtet man das Gesamtsystem einer Bakterienkultur (Zellen, Substrat und Stoffwechselprodukte), so ist nur in wenigen Fällen mit einem Gewinn an organischem Kohlenstoff zu rechnen. Unter anaeroben Bedingungen, bei Gärungsprozessen, kann eine Vermehrung des organisch gebundenen Kohlenstoffs durch energetisch leicht zu bewältigende Carboxylierungsreaktionen von Spaltprodukten erfolgen. An einem solchen System, der Vergärung von Glycerin durch Propionibakterien, ist die heterotrophe CO_2 -Fixierung zum ersten Male beschrieben worden (WOOD u. WERKMANN 1936, 1938). Unter aeroben Bedingungen ist ein bilanzmäßig erfaßbarer C-Gewinn nur bei solchen Organismen zu erwarten, welche ein Substrat nur teilweise dehydrieren und nicht zu CO_2 und H_2O oxydieren; das könnte beispielsweise bei der *Suboxydans*-Gruppe der Essigsäurebakterien der Fall sein. In allen anderen Fällen wird das im Rahmen der Endoxydation gebildete Kohlendioxyd mengenmäßig überwiegen. Eine CO_2 -Fixierung läßt sich dann also durch Messung der Kohlenstoffbilanz nicht nachweisen, auch wenn von einem Organismus Kohlendioxyd in Substratmengen in den Stoffwechsel einbezogen werden sollte; der exakte Nachweis einer CO_2 -Fixierung ist hier an den Einsatz von markierten Verbindungen gebunden.

Unsere Frage zielte nicht auf den C-Gewinn durch CO_2 -Fixierung, sondern auf die Beteiligung des Kohlendioxyds am Stoffwechsel einiger Bakterienstämme und bei Verwertung verschiedener Substrate ab. Unter Verwendung radioaktiven Kohlendioxyds suchten wir zu bestimmen, wieviel Kohlendioxyd aus dem Suspensionsmedium während der Sub-

stratoxydation in den Zellen festgelegt wird; es sollten stöchiometrische Beziehungen zwischen Sauerstoffaufnahme, Substratassimilation und CO₂-Einbau in die Zellsubstanz aufgefunden werden.

Bei den meisten der von uns untersuchten Bakterienarten und Substraten ist über die Wege des Substratabbaues noch nichts bekannt. Da für das *Mycobacterium* (IVS-B) der Abbauvorgang und die damit verbundene Kohlendioxyd-Fixierung bereits gut untersucht worden sind (LYNEN u. Mitarb. 1959), bezogen wir es in die Untersuchung ein und stellten auch die quantitativen Beziehungen zwischen dem Einbau von ¹⁴CO₂ und Isovaleriansäure in die Zellsubstanz fest.

Um zunächst eine Übersicht über das Ausmaß des Kohlendioxydeinbaus bei verschiedenen Bakterienstämmen und bei Verwendung mehrerer Substrate zu gewinnen, verfolgten wir die Sauerstoffaufnahme ($-\Delta O_2$) und den Einbau von radioaktivem Kohlendioxyd ($-\Delta CO_2$) aus dem Suspensionsmedium in die Zellen. Durch Zusatz von (NH₄)₂SO₄ zur Suspensionslösung wurden Wachstumsbedingungen (+ N) hergestellt; in Abwesenheit von gebundenem Stickstoff ($-N$) war kein Wachstum möglich. Die Leeratmung und der mit ihr verknüpfte CO₂-Einbau wurden in einer substratfreien Kontrolle unter den gleichen Bedingungen bestimmt. Um Faktoren, die auf der wechselnden Stoffwechselaktivität der Bakterienstämme beruhen, zu eliminieren, wurde der CO₂-Einbau auf die O₂-Aufnahme bezogen. Der CO₂/O₂-Quotient stellt ein relatives Maß für den Kohlendioxydeinbau dar. In den Tabellen 1, 2 u. 3 sind die experimentell ermittelten Daten und Quotienten protokollartig aufgeführt.

a) Oxydative Assimilation von Isovaleriansäure, Isobuttersäure und Propionsäure

Unter den bisher geprüften Substraten wird die oxydative Assimilation der Isovaleriansäure vom stärksten CO₂-Einbau begleitet (Tab. 1 u. Abb. 3). Besonders hoch ist der CO₂/O₂-Quotient bei dem aus Erde isolierten *Mycobacterium* (IVS-B); die Einbauleistung des Pansenstammes ist bedeutend geringer. Es ist zu bemerken, daß der CO₂-Einbau bei der oxydativen Assimilation von IVS von der Anwesenheit von gebundenem Stickstoff nahezu unabhängig ist; das deutet darauf hin, daß die CO₂-Fixierung hier nicht an die Synthese stickstoffhaltiger Zellbestandteile gebunden sondern mit dem Substratumsatz in mehr direkter Weise verknüpft ist.

Über den Abbau der Propionsäure liegen Untersuchungen an tierischen Geweben vor (PENNINGTON 1952, 1954, 1955, 1956; FLAVIN, ORTIZ u. OCHOA 1955; FRIEDBERG, ADLER u. LARDY 1956; LARDY u. ADLER 1956; TIETZ u. OCHOA 1959). Durch lösliche Enzyme aus Rinderlebermitochondrien und Schweineherzextrakten wird Propionsäure als CoA-Verbindung

zu Methyl-Malonyl-CoA carboxyliert und in Bernsteinsäure übergeführt. Wenn Bakterien Propionsäure nach demselben Schema umsetzen würden, wäre mit einem hohen CO_2 -Einbau in die Zellsubstanz zu

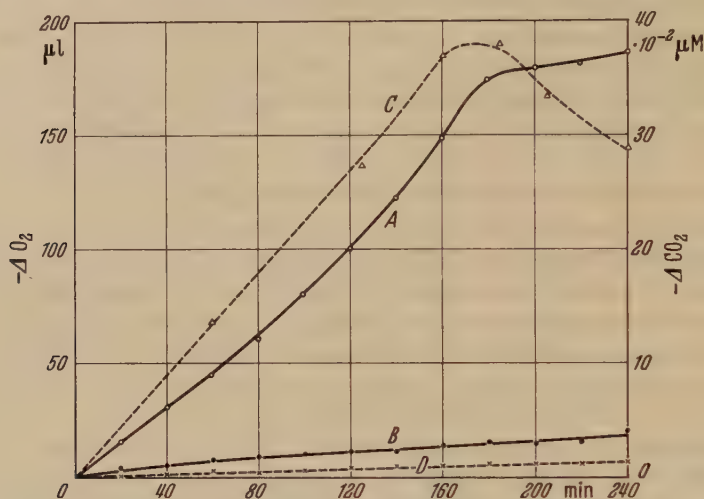


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf von Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydeinbau durch *Mycobacterium* spp. (IVS-B). Die Atmung wurde in doppelarmigen Warburggefäßen mit 2 ml Suspension (0,272 mg Trockengewicht) in Minerallösung + 2,5 μMol IVS in Gegenwart von Pardee-Puffer und 1% CO_2 gemessen. Kurve A: mit 2,5 μMole Substrat; Kurve B: substratfreie Kontrolle. Der CO_2 -Einbau wurde in Parallelgefäßen, die an Stelle von CO_2 10 μMole $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ enthielten, gemessen. Kurve C: mit 2,5 μMol IVS; Kurve D: substratfreie Kontrolle

Tabelle 1. Beziehungen zwischen Sauerstoffaufnahme und CO_2 -Einbau während der oxydativen Assimilation und Leeratmung verschiedener Bakterienstämme

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bakterienstamm	N-Quelle	Trockengewicht (in mg)	Meßzeit (in min)	Substrat (in μMol)	$-\Delta\text{O}_2$ (in μMol)	$-\Delta\text{CO}_2$ (in μMol)	$\frac{-\Delta\text{CO}_2}{-\Delta\text{O}_2}$	$\frac{-\Delta\text{CO}_2}{\text{mg-Zellen}}$
IVS-B	+	0,272	100	2,5 IVS	3,65	0,219	0,0615	0,806
	+	0,272	100	—	0,446	0,00424	0,0095	0,016
	—	1,0	60	25 IVS	4,19	0,186	0,0444	0,186
	—	1,0	60	—	1,23	0,0125	0,0105	0,0125
IVS-W	+	0,76	60	2,5 IVS	6,74	0,29	0,0430	0,381
	+	0,76	60	—	0,849	0,0064	0,0075	
IBS-H	+	2,73	80	25 IBS	4,91	0,033	0,00674	0,0121
	+	2,73	80	—	1,09	0,005	0,0045	
	—	1,0	60	25 IBS	8,60	0,012	0,0014	0,012
IBS-W	+	1,46	100	2,5 IBS	2,99	0,0059	0,00196	0,004
	+	1,46	100	—	2,1	0,0050	0,002	
	—	1,0	60	25 IBS	2,66	0,0034	0,00128	0,0034
PS-B	+	0,82	100	2,5 PS	2,72	0,0426	0,0157	0,052
	—	0,82	100	2,5 PS	4,9	0,0166	0,0034	0,0203
PS-W	—	1,0	60	25 PS	8,64	0,0229	0,0027	0,023

rechnen. Unsere Ergebnisse entsprechen diesen Erwartungen nicht: weder bei dem aus Erde noch bei dem aus Panseninhalt isolierten Stamm (*PS-B* und *PS-H*) wird die oxydative Assimilation der Propionsäure von einer bemerkenswert hohen CO_2 -Fixierung begleitet (Tab. 1).

Isobuttersäure wurde durch das Pansenepithel und Nierenschnitte des Schafes unter Bildung von Essigsäure und Propionsäure umgesetzt

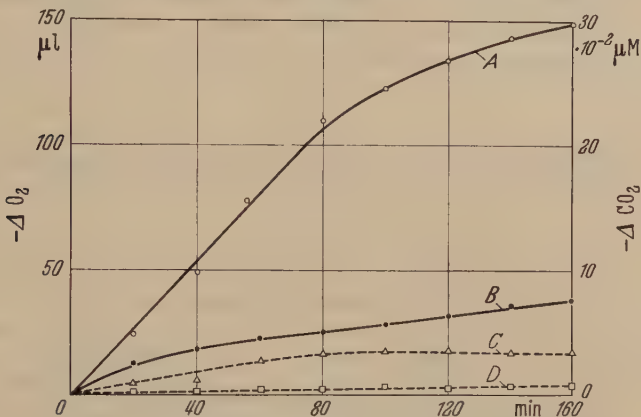


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf von Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydeinbau durch ein Isobuttersäure oxydierendes Bakterium (Stamm *IBS-H*). Atmungsmessung wie Abb. 3; je Gefäß 2 ml Suspension = 2,73 mg Trockengewicht. (Kurve A: mit 2,5 μMol IBS; Kurve B: substratfreie Kontrolle). Zur Bestimmung des CO_2 -Einbaus werden 20 ml Zellsuspension in 200 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 μMol IBS und 160 μMol $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ geschüttelt (Kurve C: mit 25 μMol IBS; Kurve D: substratfreie Kontrolle)

(ANNISON u. PENNINGTON 1954). Bei der Inkubation von Rattenleber-mitochondrien mit Isobuttersäure, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, ATP und Mg wurde ^{14}C in Äpfelsäure und Bernsteinsäure eingebaut (FRIEDBERG, ADLER u. LARDY 1956). Mit n-Valeriansäure und Propionsäure waren die Einbauleistungen noch größer; es ist möglich, daß Isobuttersäure zunächst in Propionsäure überführt wird (KINNORY, TAKEDA u. GREENBERG 1955) und eine Carboxylierung erst auf der Stufe der Propionsäure zu Methylmalonsäure erfolgt. Über die Verwertung und den Abbaumechanismus von Isobuttersäure durch Bakterien liegen noch keine Angaben vor. In Anbetracht der Befunde, die bisher an tierischen Präparaten erhoben wurden, erscheint der CO_2 -Einbau während der Oxydation von IBS durch die beiden Pansenstämme *IBS-H* (Abb. 4) und *IBS-W* überraschend gering.

b) Oxydation von Äthanol

RASUMOWSKAJA u. BJELOASOWA (1952) fanden, daß *Acetobacter schützenbachii* mit Alkohol als Substrat nicht wächst, wenn Kohlendioxyd durch KOH laufend absorbiert wird. Auch *Acetobacter acidophilum*, der von Buchenholzspänen einer Essigfabrik frisch isoliert

worden war, benötigt zum Wachstum auf einem komplexen Äthanol und Hefeextrakt enthaltenden Medium Kohlendioxyd; nach vorläufigen Untersuchungen wurde $^{14}\text{CO}_2$ in die basischen Aminosäuren eingebaut (WIAME, HARIGNY und DOTHEY 1959). Eigene Wachstumsversuche hatten dasselbe Ergebnis. Da durch die „Schnellessigbakterien“ nur äußerst geringe Substratmengen endoxydiert werden und dem Medium zugesetztes radioaktives Kohlendioxyd innerhalb der Zellen nur unwesentlich durch Atmungs- CO_2 verdünnt werden dürfte, müßte sich eine Fixation von Kohlendioxyd mit Hilfe von $^{14}\text{CO}_2$ besonders leicht nachweisen lassen.

Tabelle 2. Beziehungen zwischen Sauerstoffaufnahme und CO_2 -Einbau während der oxydativen Assimilation und Leerratung verschiedener Essigbakterien

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bakterienstamm	N-Quelle	Trockengewicht (in mg)	Meßzeit (in min)	Substrat (in μMol) Äthanol	$-\Delta\text{O}_2$ (in μMol)	$-\Delta\text{CO}_2$ (in μMol)	$\frac{-\Delta\text{CO}_2}{-\Delta\text{O}_2}$	$-\Delta\text{CO}_2$ mg-Zellen
<i>A. peroxydans</i>	+	0,28	100	5	9,3	0,0101	0,0011	0,036
	—	0,28	100	5	9,31	0,0019	0,0002	0,0067
<i>A. aceti</i>	+	0,34	100	5	10,33	0,0204	0,00197	0,06
	—	0,34	100	5	10,06	0,0187	0,00186	0,055
<i>A. xylinum</i>	—	0,56	100	10	12,41	0,0123	0,0099	0,022
<i>A. melanogenum</i>	—	0,9	80	10	8,60	0,0039	0,00046	0,0044
<i>A. suboxydans</i>	—	0,61	120	25	10,45	0,031	0,00296	0,051

Unsere Versuche haben jedoch gezeigt, daß Essigsäurebakterien während der Oxydation von Äthanol sowohl unter Wachstumsbedingungen als auch als „gewaschene Suspensionen“ CO_2 nur in geringem Umfang fixieren (Tab. 2 u. Abb. 5). Bei ihnen ist Kohlendioxyd an der Zellsubstanzsynthese demnach nicht in nennenswertem Umfang beteiligt.

Die Ursache für ihr CO_2 -Bedürfnis konnte nicht erklärt werden.

c) Oxydation von Glucose

Bemerkenswert hoch ist der CO_2 -Einbau in die beiden geprüften Stämme von *Escherichia coli* (Tab. 3). Diese hohe Fixationsleistung überrascht um so mehr, als der Abbau und die Verwertung der Glucose im Zellstoffwechsel nicht zwangsläufig an eine Carboxylierung gebunden sind. Daß die CO_2 -Fixierung hier nicht mit einleitenden Reaktionen des Substratabbaues, sondern mit der Synthese von Nucleinsäure- und Proteinkomponenten verknüpft ist, zeigt der große Unterschied im CO_2/O_2 -Quotienten zwischen Wachstumsbedingungen (+N) und Abwesenheit von Ammonsulfat (—N). Die O_2 -Aufnahme ist unter beiden Bedingungen etwa gleich groß; lediglich der Weg des assimilierten

Substrats ist unter beiden Bedingungen verschieden: unter Wachstumsbedingungen werden Proteine und Nucleinsäuren aufgebaut, unter N-Ausschluß wird Glucose vorwiegend zur Speicherstoffsynthese genutzt.

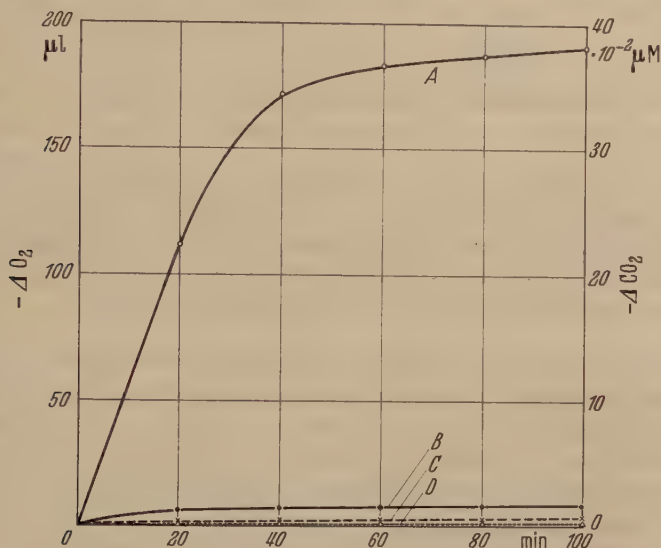


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf von Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydeinbau durch *Acetobacter melanogenum*. Atmungsmessung wie Abb. 3; 2 ml Zellsuspension = 0,9 mg Trockengewicht; (Kurve A: mit 10 μ Mol Äthanol; Kurve B: substratfreie Kontrolle). Zur Bestimmung des CO₂-Einbaus wurden 20 ml Suspension in 200 ml Erlenmeyerkolben mit 100 μ Mol Äthanol und 100 μ Mol NaH¹⁴CO₃ geschüttelt (Kurve C: mit 100 μ Mol Äthanol; Kurve D: substratfreie Kontrolle)

Tabelle 3. Beziehungen zwischen Sauerstoffaufnahme und CO₂-Einbau während der oxydativen Assimilation von Glucose durch *Enterobacteriaceae*

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bakterienstamm	N-Quelle	Trockengewicht in (mg)	Meßzeit (in min)	Substrat (in μ Mol) Glucose	$-\Delta O_2$ (in μ Mol)	$-\Delta CO_2$ (in μ Mol)	$\frac{-\Delta CO_2}{-\Delta O_2}$	$\frac{-\Delta CO_2}{\text{mg Zellen}}$
<i>E. coli</i> K-12	+	0,88	100	2,5	6,82	0,206	0,0307	0,2335
	—	0,88	100	2,5	7,10	0,033	0,0047	0,038
	—	0,88	100	—	1,41	0,003	0,0023	
<i>E. coli</i> B	+	0,72	100	2,5	4,04	0,169	0,042	0,235
	—	0,72	100	2,5	4,37	0,0216	0,005	0,0302
	—	0,72	100	—	0,47	0,0043	0,0091	
<i>S. marcescens</i>	+	1,76	100	5	7,85	0,0107	0,00136	0,0061
	—	1,76	100	5	7,2	0,0048	0,00067	0,00273
	—	1,75	100	—	1,85	0,0011	0,00063	

In der Gegenüberstellung der CO₂/O₂-Quotienten, die in Gegenwart und Abwesenheit gebundenen Stickstoffs mit IVS (*Mycobacterium*)

einerseits und Glucose (*E. coli*) andererseits gemessen wurden, kommt die grundverschiedene Funktion des Kohlendioxyds beim Umsatz beider Substrate deutlich zum Ausdruck:

Bakterienstamm	Substrat	CO ₂ /O ₂ -Quotient	
		+ N	- N
<i>Mycobacterium</i>	IVS	0,0615	0,0444
<i>E. coli</i>	Glucose	0,0420	0,0050

Bei der Umsetzung von Isovaleriansäure ist Kohlendioxyd schon an den einleitenden Schritten des Substratabbaues beteiligt; der CO₂-Einbau im Zuge der Speicherstoffsynthese ist von der Anwesenheit von N-Verbindungen nahezu unabhängig. Bei *E. coli* wird CO₂ erst bei der Synthese N-haltiger Zellbestandteile eingebaut.

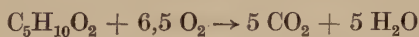
d) Beziehung zwischen CO₂- und Substrat-Einbau

Bei der Oxydation organischer Substrate wird im Zuge der Endoxydation Kohlendioxyd freigesetzt. Zwischen diesem endogenen Kohlendioxyd und dem zugesetzten radioaktiven Kohlendioxyd wird sich ein Gleichgewicht einstellen. Es ist nicht abzusehen, in welchem Umfang das zu Carboxylierungsreaktionen verwertete CO₂ aus dem endogenen und exogenen CO₂ stammt. Um diese Frage zu klären, untersuchten wir den Substrat- und CO₂-Einbau durch *Mycobacterium* (IVS-B) eingehender, da für diesen Stamm der Mechanismus des Substratumsatzes und der Carboxylierung durch enzymchemische Untersuchungen bereits aufgeklärt worden ist (LYNEN u. Mitarb. 1959).

Das Studium der Umwandlung von Leucin zu Acetessigsäure hatte erkennen lassen, daß der Leucinabbau über Isovaleriansäure als Zwischenprodukt führt. In den weiteren Abbauweg der IVS ist eine Carboxylierungsreaktion eingeschaltet (COON u. Mitarb. 1954, 1956). Nach Untersuchungen mit Extrakten aus Rattenleber und Schweineherz (BACHAWAT, ROBINSON u. COON 1956) wird angenommen, daß IVS auf der Stufe des β -Hydroxy-isovaleryl-CoA zu Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA carboxyliert wird. Eingehende Studien über die Einzelschritte der Carboxylierung an einem Extrakt aus dem mit IVS als C-Quelle gewachsenen *Mycobacterium* (Stamm IVS-B) durch LYNEN u. Mitarb. (1959) führten zur Aufdeckung der einzelnen Reaktionsschritte, zur Anreicherung der beteiligten Enzyme und schließlich zur Isolierung des Cofaktors der Carboxylierungsreaktion, einer CO₂-Biotin-Verbindung (LYNEN u. Mitarb. 1959). Danach stellt sich die Umsetzung vom β -Methyl-Crotonyl-CoA, dem Dehydrierungsprodukt des Isovaleryl-CoA, ausgehend folgendermaßen dar: β -Methyl-Crotonyl-CoA wird durch Methyl-Crotonyl-carboxylase in Gegenwart von CO₂ und ATP zu β -Methyl-glutaconyl-CoA carboxyliert; unter Bildung von β -Hydroxy- β -Methyl-glutaryl-CoA wird durch Methyl-glutaconase Wasser angelagert und dieses wichtige Zwischenprodukt schließlich unter Bildung von Acetyl-CoA und Acetessigsäure gespalten. Durch diese Reaktionen wird Isovaleriansäure in die bekannten Wege des Intermediärstoffwechsels eingeschleust. Der Reaktionsweg stellt den interessanten Fall dar, daß die Substratverwertung an eine Carboxylierungsreaktion zwangsläufig gebunden ist.

Wir nehmen an, daß Isovaleriansäure durch *Mycobacterium* (*IVS-B*) auf dem enzymchemisch erschlossenen Weg abgebaut und über Acetyl-CoA synthetischen Prozessen zugeleitet wird. Wenn zur einleitenden Carboxylierung und Assimilation der Isovaleriansäure zur Zellsubstanzsynthese lediglich das der Zelle von außen angebotene CO₂ verwertet werden würde, müßte je Molekül eingebaute IVS ein Molekül radioaktives Kohlendioxyd fixiert werden. Dieses CO₂/IVS-Verhältnis erreicht mit dem Wert 1 die theoretische obere Grenze. Der im Experiment ermittelte Wert wird stets kleiner sein, da im Zuge der oxydativen Assimilation ein Teil des Substrats endoxydiert wird und das gebildete nicht-radioaktive Kohlendioxyd ebenfalls zur Carboxylierung herangezogen wird. Die experimentelle Ermittlung des CO₂/IVS-Quotienten mußte Anhaltspunkte für das Ausmaß der Verdünnung von exogenem durch endogenes Kohlendioxyd liefern.

Zur Berechnung des CO₂/IVS-Quotienten war zunächst der Anteil des von den Zellen assimilierten vom insgesamt umgesetzten Substrat zu bestimmen. Die notwendigen Daten wurden der Atmungskurve (Abb. 3) entnommen. Der Stamm *IVS-B* hatte das Substrat (2,5 µMol IVS) nach 200 min vollständig umgesetzt und auf Kosten der Substratoxydation 164 µl = 7,32 µMol O₂ aufgenommen; das entspricht 2,93 µMol O₂ je 1 µMol IVS. Da theoretisch bei vollständiger Oxydation nach



6,5 Mole O₂ je Mol IVS aufgenommen werden, wurden also je Mol umgesetzter IVS $\frac{6,5 - 2,93}{6,5} = 0,55$ Mole IVS eingebaut. Folglich entspricht einer Aufnahme von 1 Mol O₂ ein Substrateinbau von 0,188 Mol IVS und eine Oxydation von 0,154 Mol IVS. Diese Daten wurden der Berechnung des CO₂/Substrat-Verhältnisses (Tab. 4, Spalte 6) zugrunde gelegt.

Für eine Versuchszeit von 100 min ergeben sich die in Tab. 4 zusammengestellten Daten. Unter Berücksichtigung des endogenen CO₂-Einbaus und der Leeratmung errechnet sich das CO₂/O₂-Verhältnis für den Stamm *IVS-B* zu 0,0695 (Tab. 4, Spalte 5). Je Mol eingebauten Substrates wurden also 0,0695/0,118 = 0,328 Mole exogenes Kohlendioxyd von den Zellen festgelegt. Der theoretische Wert von 1 Mol CO₂ je Mol IVS wird also nicht erreicht. Daß die CO₂-Fixierung nur einem Drittel der theoretisch zu erwartenden entspricht, führen wir auf die Diffusionsgrenzen zurück, die eine Gleichgewichtseinstellung zwischen endogenem und exogenem Kohlendioxyd verhindern.

Das Einbauverhältnis (CO₂/eingebautes Substrat) ließ sich in mehrfachen Wiederholungen sehr gut reproduzieren (0,31–0,35). Weshalb der

IVS-Einbau durch den Pansenstamm *IVS-W* von einem etwa nur halb so großen CO_2 -Einbau begleitet ist, haben wir vorerst noch nicht klären können.

Tabelle 4. Beziehungen zwischen CO_2 - und Substrat-Einbau während der oxydativen Assimilation unter Wachstumsbedingungen (unter Berücksichtigung des endogenen CO_2 -Einbaus und der Leeratmung)

1	2	3	4	5	6
Stamm	Substrat	$-\Delta\text{O}_2$ 1 mg	$-\Delta\text{CO}_2$ 1 mg	$-\Delta\text{CO}_2$ $-\Delta\text{O}_2$	$-\Delta\text{CO}_2$ eingebautes Substrat
<i>IVS-B</i>	IVS	11,4	0,791	0,0695	0,328
<i>IVS-W</i>	IVS	7,75	0,374	0,0483	0,255
<i>IBS-H</i>	IBS	1,40	0,0102	0,00733	0,0167
<i>PS-B</i>	PS	2,8	0,0475	0,017	0,0360

Spalte 3. O_2 -Aufnahme in $\mu\text{Mol O}_2$ je mg Zellsubstanz (Trockengewicht);

Spalte 4. $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau in $\mu\text{Mol CO}_2$ je mg Zellsubstanz (Trockengewicht);

Spalte 6. CO_2 -Einbau-Verhältnis in $\mu\text{Mol CO}_2$ je μMol eingebautes Substrat.

Für einige Stämme, bei denen sich der synthetische Wirkungsgrad der Substratverwertung mit hinreichender Genauigkeit ermitteln ließ, wurden ebenfalls Beziehungen zwischen CO_2 - und Substrat-Einbau hergestellt (Tab. 4, Spalte 6).

Diskussion

Zwischen den mit Enzymen und zellfreien Extrakten gewonnenen Erkenntnissen einerseits und den an intakten Zellen erhobenen Befunden andererseits bestehen zum Teil beträchtliche Diskrepanzen. Hinsichtlich der Abhängigkeit des Wachstums organotropher Bakterien von einem gewissen Gehalt des Nährmediums und der Atmosphäre an Kohlendioxyd besteht die Frage, welche Reaktionen in der Zelle auf die Erhaltung eines bestimmten CO_2 -Partialdruckes angewiesen sind. Mehrere der bekannten Carboxylierungsreaktionen (CALVIN u. PON 1959) gehören zum Grundstoffwechsel der Zelle. Dennoch ist das CO_2 -Bedürfnis verschiedener Stämme, Arten und Gattungen verschieden. Eine Vielzahl von Faktoren entscheidet darüber, inwieweit sich die Carboxylierungsprozesse des Zellstoffwechsels nach außen hin zu erkennen geben.

Am Modellfall eines Isovaleriansäure oxydierenden *Mycobacterium* (*IVS-B*) wurde die CO_2 -Abhängigkeit der Substratoxydation und der Einbau von Kohlendioxyd während der oxydativen Assimilation von IVS quantitativ verfolgt. Unter der Annahme, daß IVS lediglich nach Carboxylierung zu Methylglutaconsäure abgebaut und in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust wird, sollte theoretisch je Mol assimilierten Substrats ein Mol Kohlendioxyd fixiert werden. In vivo wurden jedoch von dem der Suspension zugesetzten radioaktiven Kohlendioxyd

nur 0,328 Mole ¹⁴CO₂ je Mol IVS in der Zellsubstanz festgelegt. Die Differenz zwischen dem theoretisch zu fordernden und experimentell bestimmten Einbauverhältnis ist offenbar auf die teilweise Verwertung des endogen gebildeten Atmungs-Kohlendioxys zurückzuführen.

Obwohl sich das gemessene Einbauverhältnis mit dem Stamm *IVS-B* sehr gut reproduzieren läßt, werden von verschiedenen Organismen verschiedene Anteile von exogenem und endogenem CO₂ verwertet werden. Das Einbauverhältnis wird von der Größe der Zelle, der Permeabilität der Zellmembran und anderen schwer kontrollierbaren Faktoren abhängig sein. Ein relativ niedriges Einbauverhältnis braucht demnach nicht zu bedeuten, daß kein oder nur wenig Kohlendioxyd fixiert wird. Von einem hohen Einbauverhältnis läßt sich jedoch stets auf die Beteiligung von Carboxylierungsprozessen am Stoffwechsel der Zelle schließen. In Abb. 6 sind die Einbauquotienten ($-\Delta\text{CO}_2/-\Delta\text{O}_2$) der untersuchten Stämme zum Vergleich nochmals zusammengestellt.

Das für die oxydative Assimilation von Glucose durch die beiden Stämme

von *E. coli* gemessene hohe CO₂/O₂-Verhältnis steht im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Autoren (AJL u. WERKMAN 1948, 1949; PALMSTIERNA u. EHRENSVÄRD 1956). ABELSON, BOLTON u. ALDOUS (1952) zeigten, daß während des aeroben Glucoseumsatzes 0,21 Mol CO₂ je Mol Glucose aufgenommen und vorzugsweise in Proteine und Nucleinsäuren eingebaut werden. Das eingebaute CO₂ findet sich zu 30% in der Nucleinsäurefraktion (BOLTON, ABELSON u. ALDOUS 1952). In unseren Versuchen drückt sich dieser bevorzugte Einbau in die N-haltigen Bestandteile der Zelle dadurch aus, daß in Gegenwart einer N-Quelle annähernd achtmal mehr CO₂ eingebaut wird als ohne Zusatz gebundenen Stickstoffs.

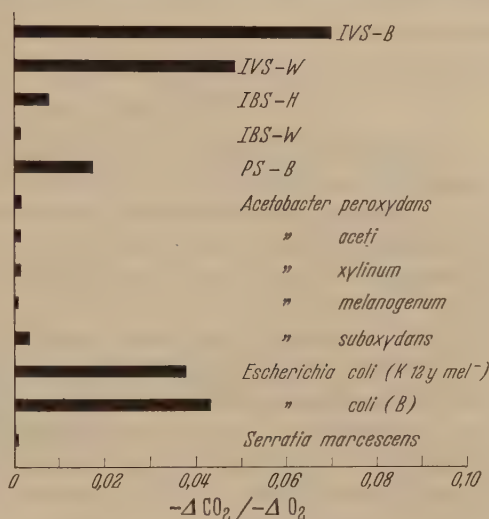


Abb. 6. Einbau von Kohlendioxyd aus der Suspensionslösung während der oxydativen Assimilation von Isovaleriansäure (1 u. 2), Isobuttersäure (3 u. 4), Propionsäure (5), Äthanol (6—10) und Glucose (11—13) durch verschiedene Bakterienarten und Stämme. Die Länge der Rechtecke veranschaulicht den $-\Delta\text{CO}_2/-\Delta\text{O}_2$ -Quotienten (unter Berücksichtigung des CO₂-Einbaus und der O₂-Aufnahme der substratfreien Kontrolle). Numerierung von oben nach unten

Die bisher untersuchten Propionsäure und Isobuttersäure oxydierenden Bakterien bauten während der oxydativen Assimilation der Substrate weniger CO_2 aus der Suspensionsflüssigkeit ein, als nach den von FLAVIN, ORTIZ u. OCHOA (1955) und KINNORY, TAKEDA u. GREENBERG (1955) an tierischen Präparaten erschlossenen Abbauwegen zu erwarten gewesen wäre. Aus der geringen Fixationsleistung kann man schließen, daß die Substrate durch unsere Stämme entweder nicht über Methyl-Malonyl-CoA abgebaut werden oder daß das benötigte Kohlendioxyd in der Zelle vorwiegend durch Transcarboxylierung zur Verfügung gestellt wird (SWICK u. WOOD 1960).

Zusammenfassung

1. Die Geschwindigkeit der Oxydation von Isovaleriansäure durch *Mycobacterium (IVS-B)* ist vom CO_2 -Partialdruck abhängig. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen ist die Sauerstoffaufnahme im Warburggefäß um so geringer, je wirksamer das Atmungs- CO_2 absorbiert wird. Warburggefäße mit verschiedenen geformten CO_2 -Absorptionseinsätzen werden verglichen.

2. Für eine Reihe von Bakterienstämmen wurden CO_2 -Einbau und O_2 -Aufnahme quantitativ bestimmt und im CO_2/O_2 -Quotienten miteinander in Beziehung gesetzt. Der Quotient wurde für die Oxydation von Isovaleriansäure, Isobuttersäure, Propionsäure, Äthanol und Glucose ermittelt. Der CO_2 -Einbau ist bei der Oxydation von Isovaleriansäure durch *Mycobacterium (IVS-B)* und von Glucose durch *E. coli (B u. K12)* besonders hoch.

3. Während der oxydativen Assimilation von Isovaleriansäure sollte je Mol eingebauten Substrats ein Mol Kohlendioxyd gebunden werden; von den Zellen wurden jedoch nur 0,328 Mole $^{14}\text{CO}_2$ aus dem zugesetzten $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ je Mol eingebauter Isovaleriansäure aufgenommen.

Die Untersuchung wurde durch eine Sachbeihilfe durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Literatur

- ABELSON, P. H., E. T. BOLTON and E. ALDOUS: Utilization of carbon dioxide in the synthesis of proteins by *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* **198**, 165—172 (1952).
- AJL, S. J., and C. H. WERKMAN: Replacement of CO_2 in heterotrophic metabolism. *Arch. Biochem.* **19**, 483—492 (1948).
- AJL, S. J., and C. H. WERKMAN: On the mechanism of carbon dioxide replacement in heterotrophic metabolism. *J. Bact.* **57**, 579—593 (1949).
- ANNISON, E. F., and R. J. PENNINGTON: The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. 3. Formic, n-valeric and some branched-chain acids. *Biochem. J.* **57**, 685—692 (1954).
- BACHHAWAT, B. K., W. G. ROBINSON and M. J. COON: Carbon dioxide fixation in heart extracts by β -hydroxy-isovaleryl-coenzyme A. *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3098/99 (1954).

- BACHHAWAT, B. K., W. G. ROBINSON and M. J. COON: Enzymatic carboxylation of β -hydroxy-isovaleryl-coenzyme A. *J. biol. Chem.* **219**, 539—550 (1956).
- BOLTON, E. T., P. H. ABELSON and E. ALDOUS: Utilization of carbon dioxide in the synthesis of nucleic acid by *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* **198**, 179—185 (1952).
- CALVIN, M., and N. G. PON: Carboxylations and decarboxylations. *J. cell. comp. Physiol.* **54**, 51—74 (1959).
- CHAIK, P., A. LORTHOIS et I. ISSALY: Vitesse de respiration de *Bacillus subtilis* dans son milieu de culture. Influence de CO₂. *Biochim. biophys. Acta* **29**, 151—160 (1958).
- FLAVIN, M., P. J. ORTIZ and S. OCHOA: Metabolism of propionic acid in animal tissues. *Nature (Lond.)* **176**, 823 (1955).
- FRIEDBERG, F., J. ADLER and H. A. LARDY: The carboxylation of propionic acid by liver mitochondria. *J. biol. Chem.* **219**, 943—950 (1956).
- GEST, H., and J. L. STOKES: The effect of carbon dioxide on the reduction of methylene blue by microorganisms. *Antonie v. Leeuwenhoek* **18**, 55—62 (1952).
- GLADSTONE, G. P., P. FILDES and G. M. RICHARDSON: Carbon dioxide as an essential factor in the growth of bacteria. *Brit. J. exp. Path.* **16**, 335—348 (1935).
- HARRIS, J. O.: The influence of carbon dioxide on oxygen uptake by „resting cells“ of bacteria. *J. Bact.* **67**, 476—479 (1954).
- HES, J. W.: Function of carbon dioxide in the metabolism of heterotrophic cells. *Nature (Lond.)* **141**, 647 (1938).
- HUHTANEN, C. N., F. J. CARLETON and H. R. ROBERTS: Carbon dioxide utilization by rumen microorganisms. *J. Bact.* **68**, 749—751 (1954).
- KINNORY, D. S., Y. TAKEDA and D. M. GREENBERG: Isotope studies on the metabolism of valine. *J. biol. Chem.* **212**, 385 (1955).
- KLUYVER, A. J.: Die Kohlensäure im Stoffwechsel der Lebewesen. *Suom. Kemistil., Ser. A* **12**, 81—88 (1939).
- KREBS, H. A.: The use of „CO₂ Buffers“ in manometric measurements of cell metabolism. *Biochem. J.* **48**, 349 (1951).
- LARDY, H. A., and J. ADLER: Synthesis of succinate from propionate and bicarbonate by soluble enzymes from liver mitochondria. *J. biol. Chem.* **219**, 933—950 (1956).
- LYNCH, V. H., and M. CALVIN: Carbon dioxide fixation by microorganisms. *J. Bact.* **63**, 525—531 (1952).
- LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING u. E. RINGELMANN: Die biochemische Funktion des Biotins. *Angew. Chem.* **71**, 481—486 (1959).
- MCLEAN, D. J., N. H. ROBINSON and E. F. PURDIE: The influence of the metabolic state and of the medium on carbon dioxide fixation by *Serratia marcescens*. *J. Bact.* **61**, 617—626 (1951).
- MCLEAN, D. J., and E. F. PURDIE: Effect of amino acids, purines, and pyrimidines on carbon dioxide fixation by *Serratia marcescens*. *J. biol. Chem.* **197**, 539—545 (1952).
- MCLEAN, D. J., and E. F. PURDIE: Effect of dicarboxylic acids, amino acids, amides, and carbohydrates on carbon dioxide fixation by *Serratia marcescens*. *J. Bact.* **69**, 204—209 (1955).
- NIEL, C. B. VAN, S. RUBEN, S. F. CARSON, M. D. KAMEN and J. W. FOSTER: Radioactive carbon as an indicator of carbon dioxide utilization. VIII. The role of carbon dioxide in cellular metabolism. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **28**, 8—15 (1942).
- PALMSTIERNA, H., and G. EHRENSVÄRD: A simple method for preparation of glucose-3,4-¹⁴C. *Acta chem. scand.* **10**, 691 (1956).

- PARDEE, A. B.: Measurement of O₂-uptake under controlled pressures of CO₂. *J. biol. Chem.* **179**, 1085 (1949).
- PENNINGTON, R. J.: The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. 1. Fatty acid utilization and ketone body production by rumen epithelium and other tissues. *Biochem. J.* **51**, 251—258 (1952).
- PENNINGTON, R. J.: The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. 2. Further studies with rumen epithelium. *Biochem. J.* **56**, 410—416 (1954).
- PENNINGTON, R. J., and T. M. SUTHERLAND: The production of succinate from propionate by carbon dioxide fixation in sheep rumen epithelial tissue. *Biochem. J.* **60**, 37 (1955).
- PENNINGTON, R. J., and T. M. SUTHERLAND: The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. 4. The pathway of propionate metabolism in rumen epithelial tissue. *Biochem. J.* **63**, 618—628 (1956).
- RASUMOWSKAJA, S. E., u. T. S. BJELOASOWA: Das Verhalten der Essigbakterien des Schnelllessigverfahrens zur Kohlensäure. *Mikrobiologija* **21**, 403—407 (1952).
- SCHLEGEL, H. G.: Die Beeinflussung des Phosphathaushalts von Mikroorganismen durch Kohlendioxyd. *Arch. Mikrobiol.* **23**, 195—206 (1955).
- SCHLEGEL, H. G.: Der Phosphatstoffwechsel als Indikator der CO₂-Verwertung. *Naturwissenschaften* **42**, 158 (1955).
- SCHLEGEL, H. G., u. R. LAFFERTY: Radioaktivitätsmessung an Einzellern auf Membranfiltern. *Arch. Mikrobiol.* **38**, 52—54 (1961).
- SLADE, H. D., H. G. WOOD, O. NIER, A. HEMINGWAY and C. H. WERKMAN: Assimilation of heavy carbon dioxide by heterotrophic bacteria. *J. biol. Chem.* **143**, 133 (1942).
- STELLMACH-HELWIG, R.: Morphologische und physiologische Eigenschaften einiger aus Schafpansen isolierter Bakterienstämme. *Arch. Mikrobiol.* **38**, 40—51 (1961).
- SWICK, R. W., and H. G. WOOD: The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **46**, 28—41 (1960).
- TIETZ, A., and S. OCHOA: Metabolism of propionic acid in animal tissues. V. Purification and properties of propionyl-carboxylase. *J. biol. Chem.* **234**, 1394—1400 (1959).
- WARBURG, O., u. G. KRIPPAHL: Weiterentwicklung der manometrischen Methode. *Z. Naturforsch.* **13b**, 434—437 (1958).
- WIAME, J. M., et S. BOURGEOIS: Le rôle de l'anhydride carbonique dans les croissances bactériennes. *Biochim. biophys. Acta* **18**, 269 (1955).
- WIAME, J. M., R. HARPIGNY and R. G. DOTHEY: A new type of *Acetobacter*: *Acetobacter acidophilum* prov. sp. *J. gen. Microbiol.* **20**, 165—172 (1959).
- WOOD, H. G., and C. H. WERKMAN: The utilization of CO₂ in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. *Biochem. J.* **30**, 48—53 (1936).
- WOOD, H. G., and C. H. WERKMAN: The utilization of CO₂ by the propionic acid bacteria. *Biochem. J.* **32**, 1262—1271 (1938).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe

Untersuchungen über den Ligninabbau und über die Oxydasen von Braun- und Weißfäulepilzen

Von
R. RÖSCH

(Mit 5 Textabbildungen)

(Eingegangen am 10. August 1960)

Aus der Gesamtheit pilzbedingter Holzschädigungen heben sich Braun- und Weißfäule durch ihre wirtschaftliche Bedeutung besonders heraus. Da alle Erreger dieser Fäuletypen zu den Basidiomyceten zählen, sind beide Gruppen auch systematisch klar abgegrenzt. Chemisch beschränkt sich die durch Braunfäulepilze bewirkte Holzzerstörung auf den Abbau der Kohlenhydrate, wobei das Lignin als Rückstand bleibt. Die Weißfäuleerreger greifen sowohl Lignin als auch Kohlenhydrate an.

HUBERT (1924) beschrieb bereits eindeutig die Unterschiede in der Chemie der beiden Abbauprozesse. Er nahm jedoch die Einteilung der Fäuletypen noch hauptsächlich nach der Farbe der Holzrestsubstanz vor, die nicht in jedem Falle typisch erscheint. Die Definition der Destruktionsfäule nach FALCK (1926) und FALCK u. HAAG (1927) stimmt insgesamt mit dem heutigen Begriff der Braunfäule überein. Die Korrosionsfäule, die FALCK am Beispiel von *Trametes radiciperda* auf Fichtenholz beschrieb, erfaßt nur einen der möglichen Sonderfälle der Weißfäulen. CAMPBELL (1932) unterteilte die Weißfäulen in drei Gruppen: 1. Weißfäulen, bei denen primär das Lignin und erst später die Cellulose angegriffen wird. 2. Weißfäulen, bei denen zuerst die Cellulose angegriffen wird und der Ligninabbau nachfolgt. 3. Weißfäulen mit gleichzeitigem Angriff auf Lignin und Cellulose.

Die Korrosionsfäule nach FALCK entspricht der 1. Gruppe, die von MEIER (1955) beschriebene sogenannte Simultanfäule der 3. Gruppe nach CAMPBELL.

Im Gegensatz zur scharfen Abgrenzung der Braunfäule gegenüber der Weißfäule stehen einige Angaben aus der Literatur, nach welchen das beim Holzabbau durch Braunfäulepilze zurückbleibende Lignin nicht mehr im ursprünglichen Zustand vorliegt, sondern chemisch verändert sein soll (SCHWALBE u. EKENSTAM 1927; APENITIS, ERDTMAN u.

LEOPOLD 1951; LEOPOLD 1951; HIGUCHI, KAWAMURA u. KAWAMURA 1955). DE STEVENS u. NORD (1954) führen einen Teil dieser Ergebnisse auf methodische Fehler zurück.

Die intensive Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Ligninchemie hat zwar in den letzten Jahrzehnten wesentliche Erkenntnisse über Biosynthese und Teilstrukturen des Lignins geliefert, jedoch konnte die Gesamtkonstitution dieses hochpolymeren Naturstoffes bis heute noch nicht aufgeklärt werden (NORD u. DE STEVENS 1958, FREUDENBERG 1959). Die Isolierung des Lignins aus dem Holz muß so schonend wie möglich erfolgen, um chemische und physikalische Veränderungen der Substanz zu vermeiden. Alle Verfahren, bei denen starke chemische Agentien (Säuren und Alkalien) und hohe Temperaturen angewandt werden, sind also nicht geeignet zur Isolierung von Lignin, das für biologische Abbauprüfungen Verwendung finden soll. Die Isolierungsmethode nach BJÖRKMAN (1954) dürfte weitgehend die Identität des so gewonnenen Präparates mit dem natürlichen Lignin im Holzverband gewährleisten. Das isolierte „native Lignin“ nach BRAUNS (1939) stellt nur eine niedermolekulare Fraktion des Gesamtlignins dar (FREUDENBERG 1954), ist aber nach Björkman-Lignin das geeignetste Präparat für biologische Untersuchungen. Widersprechend sind die Ansichten in der Ligninchemie über das „enzymatisch freigesetzte Lignin“, das entsprechend der Methode von BRAUNS (1939) jedoch nicht aus gesundem, sondern aus braunfaulem Holz gewonnen wird (FREUDENBERG 1954; FREUDENBERG 1955; NORD u. DE STEVENS 1958). Phenol-Lignin, das nach verschiedenen Verfahren unter Anwendung von Phenol und Mineralsäure aus dem Holz extrahiert werden kann, ist auf Grund der Herstellungsweise kein ideales Substrat für biologische Untersuchungen.

Eine Übersicht über die Eignung verschiedener Ligninpräparate als Kohlenstoffquelle und eine in dieser Hinsicht kritische Betrachtung früherer Veröffentlichungen zum mikrobiologischen Ligninabbau geben GOTTLIEB u. PELCZAR (1951). Zu Abbauprüfungen mit Weißfäule-Pilzen verwendeten DAY, PELCZAR u. GOTTLIEB (1949), GOTTLIEB, DAY u. PELCZAR (1950), PELCZAR, GOTTLIEB u. DAY (1950) erstmals Brauns-Lignin; von einer ausgesprochen guten Entwicklung dieser auf ihrem natürlichen Substrat sehr aktiven Ligninzer-setzer kann aber mit Lignin als alleiniger Kohlenstoffquelle in Kultur auf Grund der Versuchsergebnisse kaum gesprochen werden. Um so erstaunlicher war die Veröffentlichung von FISCHER (1953), nach der *Merulius lacrymans*, ein typischer Braunfäule-Pilz, auf Phenollignin-Agar hervorragende Entwicklung zeigte, hinter der selbst Vergleichskulturen von *Poly-stictus versicolor* zurückblieben.

Hinsichtlich der Oxydasen, die an der Biosynthese des Lignins einerseits und am Abbau des Lignins durch Weißfäulepilze andererseits

beteiligt sind, ergibt sich ein interessanter Vergleich. Daß am Aufbau des Lignins in verholzenden Pflanzenteilen nicht nur Peroxydase (LYR 1957a), sondern vor allem Laccase beteiligt ist, haben neuerdings FREUDENBERG, HARKIN, REICHERT u. FUKUZUMI (1958) eindeutig nachgewiesen. Tyrosinase dürfte nach weiteren Ergebnissen der genannten Arbeit und nach MASON u. CRONYN (1955) keine Rolle beim Verholzungsprozeß spielen. Im Gegensatz zu den negativen Ergebnissen von HIGUCHI (1953) erzielten GOTTLIEB u. GELLER (1949), DION (1952), FÄHRAEUS (1953) und VAN VLIET (1954) mit Pilz-Oxydasen einen oxydativen Angriff auf verschiedene Ligninpräparate. Die Beteiligung extracellulärer Oxydasen am Abbau des Lignins durch Weißfäulepilze ist zwar experimentell noch nicht eindeutig gesichert. Auffallend ist aber die Tatsache, daß Laccase und Peroxydase als Ektoenzyme bisher, soweit bekannt, nur bei der Weißfäulegruppe der holzerstörenden Basidiomyceten nachgewiesen werden konnten, und daß Weißfäulepilze anscheinend grundsätzlich zumindest mit einem dieser beiden Fermente ausgestattet sind. Tyrosinase, die normalerweise nur intracellulär auftritt, findet sich bei verschiedenen Arten beider Fäulegruppen. Eine Beziehung dieses Fermentes zum Ligninabbau ist daher nicht anzunehmen.

Vorkommen, Nachweis, quantitative Bestimmung und Eigenschaften von Pilz-Peroxydasen wurden neuerdings von LYR eingehend behandelt (LYR 1955, 1956, 1957b, 1958). Die verwirrende Nomenklatur der Phenoloxidasen wird sowohl von BOLDIN (1951) wie auch von LINDEBERG u. HOLM (1952) hervorgehoben. Im folgenden werden die Bezeichnungen Tyrosinase und Laccase im Sinne der in diesen beiden Arbeiten gegebenen Definitionen verwendet. Bezüglich der Substratspezifität der Pilz-Tyrosinase muß aber an dieser Stelle schon im Hinblick auf eigene Untersuchungen darauf hingewiesen werden, daß nach den Angaben von GRAUBARD (1939), BOLDIN (1951) und LYR (1958) Guajacol von diesem Ferment nicht oxydiert werden soll.

BAVENDAMM (1928a, 1928b) entwickelte eine Methode zur Unterscheidung von Braun- und Weißfäulepilzen, die im Prinzip auf dem Fehlen extracellulärer Oxydasen bei der Braunfäulegruppe beruht. NOBLES (1958) gibt eine Zusammenstellung der zahlreichen Arbeiten über Anwendung und Weiterentwicklung der Bavendamm-Methode und einiger neuer, qualitativer Untersuchungsverfahren. LYR (1958) unterzieht die bisherige Methodik einer kritischen Betrachtung und bringt einige wesentliche Verbesserungsvorschläge.

Aus mehreren Veröffentlichungen seit BAVENDAMMS ersten Arbeiten in dieser Richtung geht hervor, daß fast bei allen Testmethoden Grenzfälle auftreten, bei denen die Ergebnisse verschiedener Verfahren am gleichen Objekt oder Holzabbautypus und Oxydasenreaktion nicht

übereinstimmen. Selbst für einige der wichtigsten Holzerstörer aus der Braunfäulegruppe sind widersprechende Angaben in der Literatur zu finden. *Merulius lacrymans* ergab nach BAVENDAMM (1928a), JÖRGENSEN u. VEILBY (1953) und NOBLES (1958) keine Reaktionen. Die teilweise positiven Befunde nach BAVENDAMM (1928b) mit absterbendem Mycel können auf die Wirkung freigesetzter Tyrosinase zurückgeführt werden. ZOBERT (1952) erhielt aber mit einem aus dem Mycel gewonnenen Fermentpräparat außer den zu erwartenden Reaktionen mit Brenzcatechin, Pyrogallol, p-Kresol und Tannin auch eindeutig eine Oxydation von Guajacol und Hydrochinon und eine fragliche Reaktion mit p-Phenylendiamin. HIGUCHI u. KITAMURA (1953) gaben andererseits an, daß der Mycelextrakt Guajacol und α -Naphthol nicht oxydierte und daß die Reaktion mit Hydrochinon fraglich war. *Coniophora cerebella* bildet nach LYR (1958) keine der drei Oxydasen. Den vielen negativen Testergebnissen (BAVENDAMM 1928a, DAVIDSON, CAMPBELL u. BLAISDELL 1938, PRESTON u. Mc LENNAN 1948, LAW 1950, BOLDIN 1951, JÖRGENSEN u. VEILBY 1953, NOBLES 1958) steht die Beobachtung von ETHERIDGE (1957) gegenüber, wonach drei Stämme dieser Art zwar nach der eigenen Prüfungsmethode des Verfassers auf extracelluläre Oxydasen keine Reaktion ergaben, jedoch nach dem Bavendamm-Verfahren positiv reagierten. Schließlich erhielt LAW (1955) mit dem Kulturfiltrat einen schwach positiven Guajacum-Test ohne Brenzcatechin-Zusatz, eine Reaktion, die nicht auf Tyrosinase-Wirkung beruhen kann. *Poria vaporaria* gab nach DAVIDSON, CAMPBELL u. BLAISDELL (1938), JÖRGENSEN u. VEILBY (1953) und FUKUZUMI (1953) keine Oxydasenreaktionen. BAVENDAMM (1928b) erhielt mit dieser Art zwar positive Ergebnisse, bezweifelte aber selbst die Identität des verwendeten Stammes. Nach HIGUCHI u. KITAMURA (1953) reagierte der Mycelextrakt weder mit Tannin noch mit Hydrochinon oder Guajacol, während der extrahierte Mycelrückstand eine positive Guajacol-Reaktion zeigte.

Aus den dargestellten Problemen ergaben sich zwei wesentliche Fragen, deren Klärung zum Ziel eigener Untersuchungen gesetzt wurde: 1. Sind ausgesprochene Braunfäulepilze tatsächlich befähigt, isoliertes Lignin als Kohlenstoffquelle zu verwerten? 2. Sind alle abweichenden Phenolasenreaktionen typischer Braunfäulepilze nur auf freigesetzte Tyrosinase zurückzuführen?

Wenn einerseits die Ligninabbauversuche mit *Merulius lacrymans* nach FISCHER (1953) reproduzierbar sind, dann ist die Trennung der beiden Fäulegruppen nicht mehr gerechtfertigt. Wenn andererseits mit Substraten, die außerhalb des Wirkungsspektrums der Tyrosinase liegen, Reaktionen auftreten, ist zu prüfen, ob der Substratbereich der Tyrosinase selbst weiter gefaßt werden muß, oder ob in den Mycelien der Braunfäulepilze eine weitere intracelluläre Oxydase gebildet wird.

A. Material und Methodik

Pilzstämme: In Tab.1 sind die Braun- und Weißfäule-Stämme aufgeführt, die zu den eigenen Untersuchungen herangezogen wurden. Die Kennziffern in der zweiten Spalte der Tabelle werden in der weiteren Abhandlung zur kurzen Bezeichnung des jeweiligen Stammes verwendet.

Tabelle 1

Art	Kennziffer	Stamm	Herkunft
<i>Merulius lacrymans</i> (Wulf.) Schum. ex Fries.	Ic	M 36 Ürdingen	Hann. Münden
	Id	Falck	Baarn
	Ig	Wien	Wien
<i>Merulius silvester</i> Falck	IIb	CBS	Baarn
	IIc	Weimar 1	Weimar
	IId	Weimar 2	Weimar
<i>Coniophora cerebella</i> (Pers.) Duby	III	Hann. Münden	Hann. Münden
	IIIo	Portugal 5c	Eberswalde
	IIIp	Eberswalde 5a	Eberswalde
<i>Poria vaporaria</i> (Pers.) Fr.	IVk	Falck	Baarn
	IVl	R 18 Schweden	Berlin
	IVm	Rabanus	Berlin
<i>Polystictus versicolor</i> (L.) Fr.	XIe	Mounce	Baarn
<i>Pholiota destruens</i> Brond.	XIII m	Bavendamm	Baarn
<i>Ganoderma lucidum</i> (Leyss.) Karst.	XIVg	Dobel	Karlsruhe
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) Fr.	XVIr	Karlsruhe	Karlsruhe

Die Angaben über die Herkunft der Stämme in der letzten Spalte der Tabelle bedeuten im einzelnen: Baarn: Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn. Berlin: Institut für Gärungsgewerbe der Technischen Universität, Berlin. Eberswalde: Forstbotanisches Institut der Humboldt-Universität, Eberswalde. Hann. Münden: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für forstliche Mykologie und Holzschutz, Hannoversch Münden. Karlsruhe: Botanisches Institut der Technischen Hochschule, Karlsruhe. Weimar: Institut für Spezielle Botanik der Friedrich Schiller-Universität, Jena, Abt. Mykologie, Weimar. Wien: Institut für Landw. Pflanzenschutz und Forstliche Phytopathologie der Hochschule für Bodenkultur, Wien.

Chemikalien: Für die Versuche wurden nur Substanzen des im Handel erhältlichen, höchsten Reinheitsgrades, meist p.A., der Firmen Merck und Riedel de Haën verwendet. Die Agar-Nährböden wurden mit Agar-Agar DAB 6 hergestellt. Für Malzwürze-Agar wurde Löflunds Malzextrakt verwendet.

Brauns-Lignin [isoliertes, natives Fichtenlignin aus *Picea mariana* (Miller) = Black Spruce] wurde dankenswerter Weise von Herrn Professor FREUDENBERG, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Phenol-Lignin wurde aus hochgradig braunfaulem Fichtenholz (*Picea excelsa* Link) nach der in KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse (1932) angegebenen Methode von KALB, SCHOELLER u. MASTAGLIO gewonnen.

Nährlösungen: Nährlösung A: Kohlenstoffquelle berechnet auf 12,0 g Kohlenstoff; KH_2PO_4 1,5 g; NH_4NO_3 2,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5,0 mg; Aneurinhydrochlorid 2,0 mg; dest. Wasser zu 1 l. — Nährlösung B: Kohlenstoffquelle berechnet auf 12,0 g Kohlenstoff; KH_2PO_4 2,5 g; NH_4NO_3 3,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,8 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,9 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 mg; Aneurinhydrochlorid 2,0 mg; dest. Wasser zu 1 l. — Die Nährlösungen wurden mit Kalilauge so eingestellt, daß sich nach der Sterilisation ein Anfangs-pH-Wert von $5,0 \pm 0,2$ ergab. Als Stammlösung A und B werden im folgenden dieselben Lösungen ohne Kohlenstoffquelle bezeichnet. Zusammensetzung und Herstellung der Lignin-Suspensionen in Stammlösung werden im experimentellen Teil beschrieben.

Agar-Nährböden und Test-Agar-Präparate: a) Malzwürze-Agar: Malzextrakt 40,0 g; Agar 15,0 g; dest. Wasser zu 1 l; pH 5,2. — b) Glucose-Agar: Glucose-Monohydrat 33,0 g (= 12,0 g Kohlenstoff); Agar 15,0 g; Stammlösung B zu 1 l; eingestellt auf pH $5,0 \pm 0,2$. — Als Stamm-Agar B wird im folgenden ein Nährboden gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Kohlenstoffquelle bezeichnet. — c) Lignin-Agar: Lignin 20,0 g; Agar 15,0 g; Stammlösung B zu 1 l; eingestellt auf pH $5,0 \pm 0,2$. Weitere Angaben im experimentellen Teil. — d) Tannin-Agar (nach BAVENDAMM 1928a, modifiziert): Tannin 2,5 g; Malzwürze-Agar zu 1 l; pH 4,5. — e) Guajacol-Agar (nach BORDIN 1951, modifiziert): Guajacol 0,5 g; Malzextrakt 40,0 g; Agar 15,0 g; Phosphat-Citrat-Puffer 200 ml; pH 4,5; dest. Wasser zu 1 l. — f) Tyrosin-Agar: Malzextrakt 40,0 g; Agar 15,0 g; heiß gesättigte Tyrosin-Lösung zu 1 l; pH 5,2. — Die Herstellung der Test-Agar-Präparate d—f wird im experimentellen Teil beschrieben.

Stammkulturen, Vor- und Zwischenkulturen: a) Stammkulturen: Als Nährboden wurde Malzwürze-Agar verwendet. Die Überimpfung erfolgte vierteljährlich. — b) Vorkulturen: Für jede Versuchsreihe wurden Vorkulturen auf Malzwürze-Agar aus den Stammkulturen beimpft. — Nach 3 Wochen Kulturdauer wurde auf Nährlösungszwischenkulturen oder bei Agarversuchsreihen direkt auf die Nährböden überimpft. — c) Zwischenkulturen: Um bei Nährlösungsversuchen eine direkte Beimpfung aus den Agarvorkulturen zu vermeiden, wurden Zwischenkulturen mit Nährlösung eingeschaltet, aus denen nach 3 Wochen auf die Hauptkulturen überimpft wurde.

Ferment-Lösungen: a) Kulturfiltrate: Klare Filtrate aus Kulturen in 300 ml-, 1 l- und 3 l-Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml, 150 ml und 500 ml Nährlösung B (Glucose als Kohlenstoffquelle). — b) Mycelextrakte: Wäßrige Extrakte der Mycelien aus je zehn Kulturen. Das gründlich ausgewaschene Mycel wurde mit Quarz p. A. „Merck“ feinst zerrieben und mit dest. Wasser 12 Std bei 4°C extrahiert. Nach Absaugen durch Membranfilter Nr. 5 (Membran-Filter-Gesellschaft, Sartorius-Werke, Göttingen) wurden die völlig klaren Lösungen sofort zur Prüfung angesetzt. Das Volumen der Mycelextrakte wurde je zehn Einzelkulturen auf 60 oder 120 ml eingestellt. — c) Rohfermentlösungen aus Ammonsulfat-Fällungen der Kulturfiltrate und Mycelextrakte: Die Ausgangslösung wurde mit 63 g Ammonsulfat pro 100 ml versetzt und blieb 12 Std bei 4°C stehen. Durch Absaugen wurde die Fällung auf einem Membranfilter gesammelt und in dest. Wasser wieder gelöst. Nachdem die ammonisulfathaltige Lösung durch das gleiche Filter abgesaugt war, erfolgte eine 24stündige Dialyse gegen fließendes Leitungswasser sowie 2 Std gegen dest. Wasser ($\frac{1}{4}$ stündlicher Wechsel). Der Gesamtvorgang wurde ein- bis zweimal wiederholt. Die Rohfermentlösungen wurden auf 120 ml je zehn Kulturen eingestellt.

Puffer-Gemische: Zu den pH-Optimum-Bestimmungen wurden modifizierte Puffergemische nach Mc ILVAINE u. SÖRENSEN verwendet, in welchen das Dinatrium-

phosphat durch Dikaliumphosphat ersetzt war. Die Pufferskala erstreckte sich von pH 2,4—7,2 in Stufen von 0,4 pH-Einheiten.

Test-Substratlösungen: Lösungen von Guajacol, p-Kresol und Hydrochinon, jeweils 1,0 g ad 60 ml.

Sterilisation: Die Kulturgefäße mit den Nährsubstraten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 20 min im strömenden Wasserdampf sterilisiert. Das Verfahren bei Lignin-Versuchen wird im experimentellen Teil beschrieben.

Bestimmung der pH-Werte: Alle pH-Wert-Bestimmungen wurden mit dem Beckman-H2-pH-Meter durchgeführt. Die Anfangs-pH-Werte wurden nach der Sterilisation bestimmt. Zwischen- und End-pH-Werte sind jeweils die Mittelwerte aus zehn Kulturen.

Bestimmung der Mycel-Trockengewichte: Die Mycelien wurden bis zur Gewichtskonstanz bei 95° C getrocknet. Die angegebenen Werte sind jeweils das Mittel aus fünf Kulturen. Die Vorbehandlung bei Lignin-Kulturen wird im experimentellen Teil beschrieben.

Photometrische Bestimmungen: Alle Messungen wurden mit dem Filterphotometer Elko III (Zeiss) unter Verwendung von H-Cuvetten der Schichtlängen 10, 20 und 50 mm und mit Filter S 49 E (Guajacol als Substrat) durchgeführt.

B. Ergebnisse der Lignin-Abbau-Versuche

DAY, PELCZAR u. GOTTLIEB (1949) prüften 35 Weißfäulestämmen auf die Fähigkeit zur Nutzung von Brauns-Lignin, das in einer Konzentration von 0,5% in der Nährlösung suspendiert wurde. Die Gesamtergebnisse dieser Untersuchungen waren unübersichtlich und ließen nur für einige Stämme den Schluß zu, daß Lignin als Kohlenstoffquelle eventuell in geringem Maße genutzt wurde. Zu weiteren Versuchsreihen mit fünf Adaptationspassagen von jeweils 3 Wochen Kulturdauer wurden sechs der besten Stämme ausgewählt. Die Lignin-Konzentration betrug konstant 0,5%. Die Glucose-Konzentration wurde stufenweise von 0,1% in der ersten Passage bis auf 0,01% in der vierten Passage vermindert. Die Endkulturen enthielten Lignin als einzige Kohlenstoffquelle. Die Kontrollen wurden jeweils nur mit den Glucose-Mengen angesetzt, die in den Lignin-Kulturen zusätzlich enthalten waren. Die Nährlösung enthielt außer 0,5% NH_4NO_3 mit 0,1% Asparagin noch eine zusätzliche organische Stickstoffquelle. In Parallel-Reihen wurden Ruhe- und Schüttelkulturen angesetzt. Trockengewichtsbestimmungen erfolgten nach Extraktion der Mycelien mit Dioxan zur Entfernung anhaftenden Lignins. Die Trocknung wurde bei 55° C bis zur Gewichtskonstanz durchgeführt. Zwei Stämme (*Polyporus abietinus* und *Poria subacida*) zeigten Adaptation an Lignin als Kohlenstoffquelle. Die Myceltrockengewichte beider Stämme lagen für Ruhe- und Schüttelkulturen übereinstimmend bei Werten um 30 mg.

Nach GOTTLIEB, DAY u. PELCZAR (1950) konnten drei Stämme von *Polystictus versicolor* Brauns-Lignin als alleinige Kohlenstoffquelle ohne Adaptation und ohne zusätzliche organische Stickstoffquelle verwerten. DION (1952) erzielte bei derselben Art mit verschiedenen Lignin-Präparaten kein Wachstum oder nur geringe Entwicklung, wenn anorganische Stickstoffquellen verwendet wurden. Bei Zusatz organischer Stickstoffverbindungen war das Mycelwachstum besser, aber doch nicht vergleichbar mit der Entwicklung in den Glucose-Kontrollen.

Für Abbau-Versuche mit *Polystictus versicolor* und *Poria subacida* verwendete VAN VLIET (1954) enzymatisch freigesetztes Lignin, das aus braunfaulem Birkenholz nach der Methode von BRAUNS (1939) extrahiert worden war. Um thermische

Veränderungen des Lignins zu vermeiden, setzte der Autor der sterilisierten Stammlösung eine alkoholische Ligninlösung durch ein Bakterienfilter zu. Die Ligninkonzentration in der so hergestellten Suspension betrug 0,5%. Zur Entfernung des Alkohols wurde Luft durch das Filter geblasen. Die Bestimmung der Trockengewichte erfolgte nach einem Monat Kulturdauer (Schüttelkulturen) ohne vorangehende Dioxanextraktion. Die Mycelien wurden hierzu 3 Std bei 60° C getrocknet. Für *Polystictus versicolor* werden 40 mg angegeben, für *Poria subacida* Werte von 63 mg bei Beimpfung aus Holzmehl-Vorkulturen und von 29 mg bei Beimpfung aus Glucose-Agar-Kulturen.

FISCHER (1953) verwendete Phenollignin-Agar zu seinen Versuchen mit *Merulius lacrymans* und *Polystictus versicolor*. Das Lignin wurde nach der in KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse (1932) beschriebenen Methode von KALB, SCHOELLER u. MASTAGLIO aus braunfaulem Holz gewonnen. In der Veröffentlichung wie in der Original-Dissertation (FISCHER 1952) sind keine Einzelheiten über Herstellung und Zusammensetzung des Nährsubstrates angegeben. Nach FISCHER (1957) wurde eine Lösung von Phenollignin in Äthanol der Stammlösung mit den üblichen Nährsalzen und anorganischer Stickstoffquelle zugesetzt. Der Alkohol wurde durch Erhitzen entfernt. Die Lignin-Konzentration der Nährböden betrug 1%, die Agar-Konzentration 1,5%. Beide Arten wurden ohne Adaptation auf Lignin-Agar angesetzt.

Zu den eigenen Lignin-Abbauversuchen wurden folgende Stämme aus beiden Fäulegruppen herangezogen: Braunfäule: *Merulius lacrymans* Ic und Id; *Merulius silvester* IIb; *Coniophora cerebella* IIIo; *Poria vaporaria* IVk. — Weißfäule: *Polystictus versicolor* XIe; *Pholiota destruens* XIII m; *Ganoderma lucidum* XIVg; *Pleurotus ostreatus* XVIr.

Phenollignin ist aus den in der Einleitung behandelten Gründen nicht als ideales Substrat zu betrachten, mußte aber zu den eigenen Untersuchungen bei Überprüfung der Ergebnisse von FISCHER (1953) herangezogen werden. Da Björkman-Lignin nicht zur Verfügung stand, wurden Vergleichskulturen mit Brauns-Lignin angesetzt. Beide Ligninpräparate wurden vor der Verwendung in monatelangem Reinigungsprozeß vielfach umgefällt und gründlichst gewaschen. Die Ergebnisse einer Phenollignin-Agar-Versuchsreihe sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die bei diesen Untersuchungen angewandte Methodik sollte einigermaßen den Bedingungen nach FISCHER (1957) entsprechen. Zugleich war aber eine ganze Reihe von Fehlerquellen zu vermeiden oder unter Kontrolle zu halten.

Zur Herstellung von Phenollignin-Agarnährböden wurden je Kolben 50 ml Stamm-Agar B angesetzt und wie üblich sterilisiert. Nach der dritten Sterilisation wurden bei 60° C (Einstellung auf dem Memmert-Wasserbad) unter aseptischen Bedingungen jeweils 10 ml einer 10%igen Lösung von Phenollignin in Äthanol zugesetzt. Nach Verschuß der noch heißen Kulturgefäße mit gut luftdurchlässigen Zellstoffmullkompressen erfolgte sofortige Überführung in große Exsiccatoren (ohne Trockensubstanz), die 12 Std bei laufender Wasserstrahlpumpe auf 30 mm Hg evakuiert wurden. Auf diese Weise ließ sich einerseits eine Verkrustung des Lignins durch Hitzewirkung fast vollständig vermeiden, andererseits wurde das Äthanol nahezu quantitativ aus dem Nährsubstrat entfernt. Die geringen Wasserverluste bei dieser Behandlung konnten durch häufiges Bedampfen der Kolben im

Impfraum über 14 Tage ausgeglichen werden. In keinem Falle traten während dieser Zeit irgendwelche Infektionen auf.

Um eventuelles Wachstum auf dem Agar ohne Kohlenstoffquelle und durch Nutzung des restlichen Äthanol zu kontrollieren, wurden Parallelreihen mit Stamm-Agar B und ebensoleche mit Zusatz von jeweils 10 ml Äthanol (Tab.2: Stamm-Agar B + Äthanol) je Kolben angesetzt. Sämtliche Kontrollen wurden vor der Beimpfung in gleicher Weise behandelt wie die Phenollignin-Kulturen. Die Normalentwicklung der

Tabelle 2. *Mycelentwicklung von Braun- und Weißfäulepilzen auf Phenollignin-Agar und Agar-Kontrollen*
28 Tage Kulturdauer

Stamm	Phenol-Lignin-Agar	Stamm-Agar B	Stamm-Agar B + Äthanol	Glucose-Agar	Malzwürze-Agar
<i>Merulius lacrymans Ic</i>	(+)	(+)	(+)	++++	++++
<i>Merulius silvester IIb</i>	(+)	(+)	(+)	++++	++++
<i>Coniophora cerebella IIIo</i>	+	(+)	+	++++	++++
<i>Poria vaporaria IVk</i>	(+)	(+)	(+)	++++	++++
<i>Polystictus versicolor XIe</i>	+	(+)	(+)	+++	++++
<i>Pholiota destruens XIII m</i>	+	(+)	(+)	+++	++++
<i>Ganoderma lucidum XIVg</i>	++	(+)	+	++++	++++
<i>Pleurotus ostreatus XVIr</i>	+	(+)	(+)	++++	++++

Zeichenerklärung: Mycelbedeckte Oberfläche (+): 2–4 cm²; ++: bis 8 cm²; +++: bis 16 cm²; ++++: $\frac{1}{2}$ Oberfläche; +++++: $\frac{3}{4}$ – $\frac{1}{1}$ Oberfläche.

einzelnen Stämme konnte an Kontrollen mit Glucose-Agar und Malzwürze-Agar verglichen werden. Von *Merulius lacrymans Ic* und *Polystictus versicolor XIe* wurden außerdem noch Kulturen mit Brauns-Lignin-Agar angesetzt. Die Entwicklung des Hausschwamms entsprach den Phenollignin-Agar-Kulturen, *Polystictus versicolor* zeigte mit Brauns-Lignin etwas besseres Wachstum als mit Phenollignin.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Reihe lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Auf Malzwürze-Agar zeigten sämtliche geprüften Stämme optimale Entwicklung.

2. Glucose-Agar wurde nur von *Polystictus versicolor* und *Pholiota destruens* schlechter genutzt als Malzwürze-Agar.

3. Stamm-Agar B (ohne Kohlenstoffquelle) ließ eine gewisse Entwicklung aller Stämme zu, die aber zum Teil auch auf Impfstückreserven zurückgeführt werden kann. Eine zusätzliche Nutzung restlichen Äthanol (Stamm-Agar B + Äthanol) war nur bei *Coniophora cerebella* und *Ganoderma lucidum* festzustellen.

4. Keiner der geprüften Braunfäulestämme zeigte auf Phenollignin-Agar eine über das Kontrollwachstum hinausgehende Entwicklung.

5. Unter den Weißfäulepilzen war *Ganoderma lucidum* offensichtlich allein zu einer stärkeren Nutzung von Phenollignin ohne Adaptation befähigt. Bei der Beurteilung ist jedoch auch das Wachstum auf der äthanolhaltigen Kontrolle zu berücksichtigen. Die übrigen drei Stämme unterschieden sich in der Entwicklung deutlich von den Braunfäulepilzen, bedürfen aber sicher einer Adaptation zur besseren Verwertung des Substrats. Auch *Polystictus versicolor* zeigte bei gleicher Ausdehnung nur ein etwas dichteres Mycel. Der hier geprüfte Stamm *XIe* war aber auch mit besser verwertbarer Kohlenstoffquelle nicht sehr entwicklungsfreudig, wenn Stickstoff nur als anorganische Verbindung geboten wurde.

Durch Verwendung von Agar bei Lignin-Abbauversuchen kommt zu den möglichen Fehlerquellen ein weiterer Unsicherheitsfaktor hinzu. Flüssigkeitskulturen mit suspendiertem Lignin sind für derartige Untersuchungen besser geeignet. Die Zusammensetzung der Stammlösung läßt sich chemisch eindeutig definieren, und die Entwicklung ist gegenüber der visuellen Beurteilung bei Agarversuchen durch Bestimmung der Myceltrockengewichte genauer zu erfassen.

Für die eigenen Versuchsreihen ohne Adaptation und für die Endkulturen der Adaptationsreihen wurden die beiden folgenden Substrate verwendet: 1. Brauns-Lignin 1,0 g; Stammlösung A zu 50 ml. 2. Phenollignin 1,0 g; Stammlösung B zu 50 ml.

Die Herstellung der Lignin-Suspensionen erfolgte nach verschiedenen Verfahren. Bei den ersten Versuchen wurde das Gemisch wie üblich sterilisiert. Hierbei verkrustete etwa die Hälfte des Lignins durch Hitzewirkung. Durch eine Verbesserung der Methodik konnte diese thermische Veränderung des Lignins fast völlig vermieden werden. Die Kulturgefäße mit der Lignin-Suspension wurden an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 20 min im Memmert-Wasserbad auf 60° C erhitzt. Diese Behandlung erwies sich als ausreichend zur Vermeidung von Infektionen. Das dritte Verfahren entsprach insgesamt der Methodik bei Herstellung der Phenollignin-Agarnährböden. In diesem Falle wurden neben Glucose-Kontrollen mit gleichem Kohlenstoffgehalt und Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle noch weitere Kulturen mit Stammlösung und einem entsprechenden Äthanolzusatz zum Vergleich herangezogen. Auf diese Weise ließ sich die Normalentwicklung mit gut nutzbarer Kohlenstoffquelle, die Entwicklung aus Impfstückreserven und das Wachstum, das auf nicht quantitativ entferntes Äthanol zurückzuführen war, erfassen.

Vor Bestimmung der Trockengewichte wurden die Mycelien jeweils mit 25 ml Dioxan je Kolben 4 Std extrahiert. Dieses Verfahren wurde wiederholt. Trocknung und Wägung erfolgten im übrigen wie in der Methodik beschrieben (siehe S. 79). Die Abbauversuche mit Lignin-Suspensionen in Nährlösung wurden in Ruhe- und Schüttelkurven angesetzt.

Nach den Untersuchungsergebnissen von DAY, PELCZAR u. GOTTLIEB (1949) und GOTTLIEB, DAY u. PELCZAR (1950) mit Weißfäulepilzen war anzunehmen, daß Arten aus der Braunfäulegruppe, wenn sie überhaupt zur Nutzung von Lignin als Kohlenstoffquelle befähigt sind, einer längeren Adaptationszeit bedürfen. In diesem Sinne sind auch die Befunde der eigenen Versuche mit Lignin-Agar zu deuten. Zur Prüfung auf ihre Adaptationsfähigkeit an Lignin wurden zwei Stämme

von *Merulius lacrymans* (Ic und Id) und ein Stamm von *Merulius silvester* (IIb) ausgewählt. Die Gesamtkohlenstoffmenge betrug über die drei Passagen der Adaptationsversuchsreihen sowohl in den ligninhaltigen Kulturen als auch in den Glucose-Kontrollen jeweils konstant 12 g je Liter Stammlösung A. In der ersten Passage enthielten die Lignin-Kulturen Glucose und Brauns-Lignin im Verhältnis 1 : 1, in der zweiten Passage im Verhältnis 1 : 3, bezogen auf den Kohlenstoff. In den Endkulturen wurde nur Brauns-Lignin als Kohlenstoffquelle geboten. Überimpfungen und Mycelgewichtsbestimmungen erfolgten jeweils nach 84 Tagen Kulturdauer.

Die hier gewählte Methodik unterscheidet sich in folgenden Punkten von dem Verfahren nach DAY, PELCZAR u. GOTTLIEB (1949): 1. Die Zeitspanne der Einzelpassagen war entsprechend dem höheren Kohlenstoffgehalt der Nährsubstrate größer. 2. Die Kontrollen enthielten nicht nur die entsprechenden Glucose-Mengen, wie sie den ligninhaltigen Kulturen zugesetzt wurden. Lignin-Kulturen und Glucose-Kontrollen wurden mit gleichem Kohlenstoffgehalt angesetzt. 3. Die Beimpfung der Endkulturen mit Lignin als alleiniger Kohlenstoffquelle erfolgte bereits aus der zweiten Passage. Bei der relativ langen Kulturdauer ist anzunehmen, daß eine auf den Verbrauch der restlichen Glucose folgende Mangelperiode schon in der zweiten Stufe über die Möglichkeit einer Adaptation entscheidet.

Die Entwicklung in den ligninhaltigen Kulturen der ersten Passage war nach visueller Beurteilung und Mycelgewichtsbestimmung besser als in den Glucose-Kontrollen. In der zweiten Passage zeigten die Kontrollen besseres Wachstum. Die Endkulturen mit Lignin als alleiniger Kohlenstoffquelle ergaben bei allen drei *Merulius*-Stämmen eine so geringe Entwicklung, daß sich eine Mycelgewichtsbestimmung erübrigte.

Einige weitere Versuchsreihen mit den Stämmen der Braunfäulegruppe ohne Adaptation führten zu so minimalen Mycelgewichten, daß auf die Wiedergabe der Werte größtenteils verzichtet werden kann. Ruhe- und Schüttelkulturen zeigten keine wesentlichen Unterschiede. In Tab. 3 sind zum Vergleich mit den Ergebnissen der Weißfäulegruppe auch einige Myceltrockengewichte der Braunfäulepilze angeführt.

Mit den Weißfäulestämmen wurden nur Versuchsreihen ohne Adaptation angesetzt. Im Gegensatz zur Braunfäulegruppe zeigten die Ruhekulturen mit Brauns-Lignin Oberflächenmycel-Entwicklung. Die Myceltrockengewichte der Ligninkulturen lagen nach 3 Wochen übereinstimmend bei Werten um 10–15 mg, während die Glucose-Kontrollen das vier- bis zehnfache Gewicht ergaben. Die Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle lagen größtenteils unter der Grenze der Wägbarekeit.

Die Ergebnisse einer Schüttelkulturreihe beider Fäulegruppen mit Phenollignin sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Außer Phenollignin-Kulturen mit und ohne Äthanol-Zusatz und den üblichen Kontrollen wurden bei dieser Reihe noch zusätzliche Glucose-Kulturen angesetzt, die zur quantitativen Erfassung der Wirkung der Dioxanextraktion und der Trocknungstemperatur auf die Mycelgewichte herangezogen wurden.

Die Trockengewichte der Mycelien der Lignin-Schüttelkulturen waren bei den Weißfäulepilzen teilweise etwas höher als die der Ruhekulturen.

Ganoderma lucidum zeigte auch in dieser Versuchsreihe das beste Wachstum der Weißfäulegruppe mit Lignin.

In Übereinstimmung mit der im Vergleich zu den Glucose-Kontrollen doch sehr mäßigen Entwicklung aller geprüften Weißfäulepilze in den Ligninkulturen waren die pH-Werte der Kulturfiltrate bei Abschluß der Reihe kaum verändert. *Coniophora cerebella* und *Ganoderma lucidum*

Tabelle 3. *Myceltrockengewichte von Braun- und Weißfäulepilzen einer Phenollignin-Versuchsreihe mit Schüttelkulturen nach 21 Tagen Kulturdauer*

Stamm	Mycelgewichte (mg) nach Dioxanextraktion und Trocknung bei 95° C					Mycelgewichte (mg) ohne Dioxanextraktion Trocknung bei	
	Phenollignin + Stammlösung B	Phenollignin + Stammlösung B + Äthanol	Stammlösung B	Stammlösung B + Äthanol	Glucose + Stammlösung B	95° C	60° C
						Glucose + Stammlösung B	Glucose + Stammlösung B
<i>Merulius lacrymans Ic</i>	1,0	1,5	1,0	1,5	96,5	108,0	111,5
<i>Merulius silvester IIb</i>	1,0	2,0	0,5	2,0	77,0	85,0	88,5
<i>Coniophora cerebella IIIo</i>	2,0	4,5	1,0	4,0	313,5	351,0	361,5
<i>Poria vaporaria IVk</i>	0,5	1,0	—	1,0	10,0	11,0	11,0
<i>Polystictus versicolor XIe</i>	11,5	13,0	0,5	1,5	40,5	44,5	47,0
<i>Pholiota destruens XIII m</i>	12,0	15,0	1,0	2,0	45,5	50,5	53,0
<i>Ganoderma lucidum XIVg</i>	14,0	19,0	1,0	3,5	87,5	98,0	102,0
<i>Pleurotus ostreatus XVIr</i>	12,0	13,0	2,0	2,5	37,0	41,0	42,5

zeigten wieder eine etwas stärkere Nutzung des Äthanol in den Kontrollen gegenüber den anderen Stämmen. Der Vergleich der Trockengewichte dioxanextrahierter Mycelien von Glucose-Kontrollen mit den Werten, die sich ohne Vorbehandlung mit Dioxan ergaben, zeigt, daß bei diesem Verfahren eine Gewichtsminderung von durchschnittlich 10% resultiert. Die Mycelien von Glucose-Kontrollen, die ohne vorangehende Extraktion mit Dioxan bei 60° C getrocknet wurden, nahmen nach weiterer Trocknung bei 95° C noch um rund 3—5% an Gewicht ab.

NORD u. SCIARINI (1946) stellten fest, daß Äthanol als alleinige Kohlenstoffquelle von verschiedenen holzerstörenden Pilzen verwertet werden kann. Um die Wirkung nicht quantitativ entfernten Äthanols als Fehlerquelle bei Lignin-Abbauversuchen zu erfassen, wurden einige Braun- und Weißfäulestämmen in Kulturen mit 400 ml Stammlösung B angesetzt, der 0,14% Äthanol zugesetzt war. Die Kontrollen enthielten die auf den gleichen Kohlenstoffgehalt berechnete Glucose-Menge. Außerdem wurden Blindkontrollen ohne Kohlenstoffquelle angesetzt.

Tabelle 4. *Myceltrockengewichte einiger Braun- und Weißfäulepilze nach 70 Tagen Kulturdauer mit Äthanol als Kohlenstoffquelle. (400 ml Stammlösung B mit 0,14% Äthanol in 2-Liter-Kolben)*

Stamm	Mycelgewichte in mg	
	Äthanol-Kulturen	Glucose-Kontrollen
<i>Merulius lacrymans</i> Ic	3	53
<i>Merulius silvester</i> IIb	4	91
<i>Coniophora cerebella</i> IIII	24	39
<i>Polystictus versicolor</i> XIe	28	21
<i>Ganoderma lucidum</i> XIVg	36	63

Diese Versuchsreihe führte zu folgenden Ergebnissen (vgl. Tab.4):

1. *Merulius lacrymans* und *Merulius silvester* konnten Äthanol nur in sehr geringem Ausmaß verwerten. Die Entwicklung war aber noch deutlich besser als in den Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle.

2. *Coniophora cerebella* und *Ganoderma lucidum* zeigten auch hier deutlich eine gute Nutzung des Alkohols.

3. *Polystictus versicolor* entwickelte sich in den Äthanol-Kulturen besser als in den Glucose-Kontrollen. Auch in einer zweiten Versuchsreihe mit dieser Art waren die Myceltrockengewichte entsprechend.

C. Ergebnisse der Oxydasenuntersuchungen

1. Test-Agar-Versuche

BOLDIN (1951) hatte das Verfahren zur Prüfung auf Oxydasen nach BAVENDAMM (1928a, 1928b) durch Verwendung von Schrägagar in Reagensgläsern an Stelle von Agarplatten in Petrischalen methodisch abgewandelt. Auf diese Weise ließ sich zwar die Ausdehnung der Reaktionszonen nicht mehr so bequem messen; andererseits konnte aber ein größeres Pilzmaterial mit geringerem Zeit- und Substrataufwand geprüft werden. Außer der technischen Verbesserung führte BOLDIN auch eine Erweiterung der Methodik durch Differenzierung der Prüfungen auf Laccase und Tyrosinase ein.

Folgende Test-Agar-Präparate wurden hierzu verwendet: 1. Gallussäure-Agar nach BAVENDAMM; 2. Guajacol-Agar, gepuffert auf pH 4,5; 3. Hydrochinon-Agar, ebenfalls auf pH 4,5 gepuffert; 4. Tyrosin-Agar, gepuffert auf pH 7,0; 5. gemischte Tyrosin-p-Kresol-Agar-Präparate sowie p-Kresol-Agar ohne Tyrosin-Zusatz.

Nach mehreren Vorproben mit einer ganzen Reihe phenolischer Substanzen und nach einigen Variationen der Konzentration erfolgte der Ansatz der eigenen

Versuchsreihen mit Tannin-, Guajacol- und Tyrosin-Agar-Präparaten, deren Zusammensetzung in der Methodik (siehe S. 78) beschrieben ist.

Um hydrolytische oder oxydative Veränderungen des Agars zu vermeiden (DAVIDSON, CAMPBELL u. BLAISDELL 1938; LYR 1958), wurde ein Malzwürzeagar-Konzentrat gesondert sterilisiert. Der Zusatz der Testsubstratlösungen (Guajacol in Puffergemisch, Tannin in dest. Wasser) zu dem noch heißen aber nicht mehr siedenden Agar-Konzentrat erfolgte unter gründlicher Durchmischung in den Teströhrchen. Zur Herstellung des Tyrosin-Agars waren solche Vorsichtsmaßnahmen



Abb. 1. Reaktion von *Ganoderma lucidum* auf Guajacol-Agar, 14 Tage Kulturdauer. Von links nach rechts: 1 uninokulierte Malzwürze-Agar-Kontrolle; 2 uninokulierte Guajacol-Agar-Kontrolle; 3 beimpfte Malzwürze-Agar-Kontrolle; 4 beimpfter Guajacol-Agar

nicht erforderlich. Auch eine Pufferung dieses Präparates auf pH 7,0 unterblieb, da bereits die Vorproben Hinweise auf Fermentaktivität der Braunfäulepilze in tieferen pH-Bereichen ergaben.

Die Reagensgläser mit jeweils 10 ml Test-Agar wurden in senkrechter Stellung zum Erkalten aufgestellt und nicht wie üblich schräg gelegt. Durch den Ansatz auf „Senkrecht-Agar“ an Stelle von Schrägagar wurde zwar der Entwicklungsraum für den Pilz eingengt, genügte aber noch durchaus für die Versuchszwecke. Andererseits ergab sich aber eine nahezu quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da die Tiefe der Farbzonen ausgemessen (Abb. 1 und 2) und die Farbe nach der Ostwaldschen Farbmeßtafel festgelegt werden konnte. Auf diese Weise ließen sich auch Resultate zeitlich auseinanderliegender Versuchsreihen in Beziehung setzen.

Sämtliche Stämme mit Ausnahme von *Poria vaporaria* IVl und IVm, die bei Ansatz der Versuche noch nicht zur Verfügung standen, wurden auf den ausgewählten drei Testsubstraten mehrfach geprüft und zeigten keinerlei Entwicklungshemmungen. Zur Beurteilung der Pigmentausscheidung, der Trocknungseffekte im Agar und eventueller Autoxydationsreaktionen bei diesen Substraten wurden folgende Kontrollen angesetzt: 1. Beimpfte Malzwürzeagar-Kontrollen; 2. Unbeimpfte Malzwürzeagar-Kontrollen; 3. Unbeimpfte Testagar-Kontrollen.

Die Laccase-Bildner aus der Weißfäulegruppe zeigten erwartungsgemäß starke Reaktionen auf Tannin- und Guajacol-Agar mit ziemlich scharf begrenzten Farbzonen. Zwei typische Beispiele sind in den Abb. 1 und 2 mit den Reaktionen von *Ganoderma lucidum* und *Pleurotus ostreatus* dargestellt. Auch *Pholiota destruens*, eine Art, die nach ander-

weitigen Versuchsergebnissen Peroxydase aber keine Laccase bildet, oxydierte beide Substrate. Die Reaktionen der Weißfäulepilze auf Tyrosin-Agar waren nicht eindeutig, da nur vereinzelt Rotfärbung, aber keine Melaninbildung auftrat.

Bei den Braunfäulepilzen waren Verfärbungen der Substrate nur zu erwarten, wenn durch Mycelverletzung bei der Beimpfung oder durch Autolyse in späteren Stadien intracelluläre Oxydasen freigesetzt wurden.

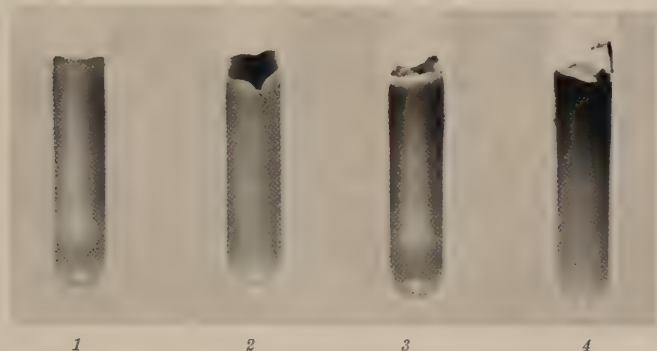


Abb. 2. Reaktion von *Pleurotus ostreatus* auf Tannin-Agar, 14 Tage Kulturdauer. Von links nach rechts: 1 uninoculierte Malzwürze-Agar-Kontrolle; 2 uninoculierte Tannin-Agar-Kontrolle; 3 beimpfte Malzwürze-Agar-Kontrolle; 4 beimpfter Tannin-Agar

Beide Vorgänge wurden erfaßt durch Beobachtung sofort nach der Beimpfung und Ausdehnung der Kulturdauer über ein Vierteljahr. Tyrosin und Tannin wurden auf die eine oder die andere Weise meist von mehreren, zumindest aber von einem der geprüften Braunfäulestämme jeder Art, oxydiert. Auch diese Reaktionen entsprachen teilweise der Erwartung, da sie eindeutig auf freigesetzte Tyrosinase zurückzuführen sind. Auffällig war aber die Oxydation von Guajacol durch die beiden *Merulius*-Arten und *Coniophora cerebella*. Für *Poria vaporaria* konnte eine solche Reaktion bei diesen Versuchen nicht festgestellt werden. Allerdings war der hier allein geprüfte Stamm *IVk* auch nicht sehr aktiv. Allgemein waren die Farbzonen bei den Braunfäulepilzen schwächer und weniger scharf begrenzt als bei der Weißfäulegruppe. Diese Erscheinung erklärt sich aus dem intracellulären Charakter der Fermente.

2. Reihenuntersuchungen an Kulturfiltraten und Mycelextrakten

Im Zusammenhang mit der bei Test-Agar-Versuchen festgestellten Guajacol-Oxydation durch Braunfäulepilze waren Beobachtungen an Mangelkulturen von *Merulius silvester* IIb (mit anderen Versuchszielen), die Stammlösung A mit 0,05% Guajacol enthielten, von Interesse. Die Nährlösung zeigte 14 Tage nach der Beimpfung dieselbe dunkelrotbraune Verfärbung, wie sie in den Parallelkulturen der

Weißfäulepilze meist sofort beim Ansatz auftrat. Auch eine reversible, starke Aufhellung der Lösung im direkten Sonnenlicht war in beiderlei Kulturen zu beobachten.

Nach diesen Ergebnissen war an möglichst umfangreichem Material die Frage zu prüfen, ob außer Guajacol auch andere Substrate, die nicht in den Wirkungsbereich der Tyrosinase fallen, oxydiert werden. Hierzu wurden sämtliche zwölf Braunftäulestämme herangezogen und die vier Weißfäulearten zum Vergleich angesetzt.

Die stets bei diesen Versuchen verwendete Nährlösung B mit Glucose als Kohlenstoffquelle war nicht optimal für die Entwicklung aller untersuchten Stämme, insbesondere nicht für die Weißfäulepilze. Die Substratzusammensetzung ergab sich in Hinblick auf die Ligninversuche, bei denen organische Stickstoffquellen auszuschließen waren. Die Nährlösung wurde auch bei diesen Untersuchungen beibehalten, da besonders *Merulius* und *Coniophora* gute Entwicklung und Fermentproduktion zeigten. Die Weißfäulepilze lieferten mit diesem Substrat bei mäßigem Wachstum ebenfalls stets reichlich Oxydasen.

Von zehn Kulturen (jeweils 50 ml Nährlösung in 300 ml Erlenmeyerkolben) wurden die Kulturfiltrate und der auf 60 ml eingestellte Mycelextrakt in Abständen von 1–2 Wochen geprüft. Das von KREBS (1960) entwickelte vereinfachte Testverfahren eignete sich besonders für derartige Reihenuntersuchungen. Guajacol, p-Kresol und Hydrochinon wurden nach einigen Vorversuchen als Substrate ausgewählt. In Reagensgläsern wurde zur Prüfung folgendes Reaktionsgemisch angesetzt (siehe Methodik S. 78–79): 1,0 ml Fermentlösung; 1,5 ml Puffergemisch; 0,3 ml Substratlösung.

Für Prüfungen auf Peroxydasen mit Guajacol als Substrat wurde eine H_2O_2 -Konzentration des Reaktionsgemisches von 0,05% eingehalten, die sich bei Untersuchungen der Kulturfiltrate von *Pholiota destruens* als optimal erwiesen hatte. Alle drei Substrate hatten den Vorteil, Infektionen während der Gesamtreaktionszeit zu verhindern. p-Kresol erlaubte außerdem eine eindeutige Unterscheidung von Tyrosinase- und Laccase-Wirkung.

Voruntersuchungen mit Mycelextrakten der Braunftäulepilze zeigten bereits an, daß die pH-Optima außerordentlich tief lagen. Die Reaktionen mit den einzelnen Substraten wurden daher jeweils für den gesamten Pufferbereich von pH 2,4–7,2 angesetzt. Bei den photometrischen Bestimmungen, zu welchen die zehnfachen Volumina an Reaktionsgemisch verwendet wurden, konnte nachgewiesen werden, daß im Laufe der Reaktionszeit nur eine geringe Verschiebung der pH-Werte (maximal 0,2 pH-Einheiten) gegenüber der angesetzten Pufferstufe erfolgte. Die laufenden Kontrollen jeder einzelnen Versuchsreihe enthielten 1 ml Kulturfiltrat oder Mycelextrakt und 1,8 ml Puffergemisch. Ferner wurden bei den Hydrochinon-Reaktionen zur Erfassung autoxydativer Verfärbungen, besonders in den höheren pH-Stufen, noch Kontrollen angesetzt, bei denen die Fermentlösung im Reaktionsgemisch durch dest. Wasser ersetzt war. Für Guajacol und p-Kresol zeigten entsprechende Ansätze mehrfach, daß innerhalb von 48 Std keine Autoxydation eintrat. Um gegebenenfalls nicht fermentbedingte Reaktionen, etwa durch den Gehalt an Schwermetallionen, zu erfassen, wurden auch Kontrollen mit sterilisierter Nährlösung angesetzt, die keinen Hinweis auf eine solche Wirkung gaben. Schließlich wurden auch die 2–3 min auf 100° C erhitzten Fermentlösungen geprüft. In jedem Falle zeigte sich hierbei entweder völlige oder doch sehr starke Inaktivierung. Um auch infektionsbedingte Fermentreaktionen ausschließen zu können, wurde bei einigen Reihen in Parallelversuchen der gesamte, kurzfristige Aufarbeitungsprozeß im Impfraum nach Bedampfung und UV-Bestrahlung durchgeführt, und die Fermentlösung durch Bakterienfilter filtriert. In den Reaktionen ergaben sich keine Unterschiede.

Die Umsetzungen wurden 10 min nach dem Ansatz und weiterhin nach 2, 4, 8, 24 und 48 Std beobachtet. Die Bewertung der Reaktionsstärke ergab sich aus dem visuellen Vergleich der einzelnen p_H -Stufen untereinander und mit den laufenden Kontrollen. Schwache Verfärbungen zu Beginn der Prüfung, die etwa unter der Wirkung reduzierender Substanzen allmählich wieder verschwanden, und Farbreaktionen, die erst nach 24 Std auftraten, wurden nur bewertet, wenn bei der nächsten Untersuchung eine insgesamt kräftigere, bleibende oder sich vertiefende Farbe auftrat, oder wenn die vorangehende Prüfung auf abnehmende Aktivität schließen ließ.

Die Kulturfiltrate der Braunftäulepilze zeigten erwartungsgemäß nur bei Autolyse infolge Überalterung geringe Reaktionen. Die Mycel-extrakte lieferten aber auffällige Ergebnisse für alle vier Arten dieser Gruppe. In den Tab. 5—7 sind die Reaktionen jeweils über ganze Kulturperioden zusammengestellt. Die gesamten umfangreichen Untersuchungsbefunde ließen sich nicht in dieser Weise darstellen. Hier mußte eine Auswahl getroffen werden, die entweder bei verschiedener Aktivität gegenüber dem einzelnen Substrat den besten Stamm jeder Art erfaßte oder bei gleicher Reaktionsstärke denjenigen Stamm, von dem die meisten Einzeldaten vorlagen.

Die Reaktion mit Guajacol, die rasch einsetzt und starke Verfärbungen bis zu braunroten Fällungen ergibt, eignet sich besonders zu Aktivitätsbestimmungen. Alle vier Arten der Braunftäulepilze oxydierten Guajacol. Die in Tab. 5 angeführten Stämme sind jeweils die aktivsten. Ein — Zeichen in der Spalte Reaktionsstärke zeigt an, daß der Stamm geprüft wurde und keine Reaktion ergab. Die + Zeichen sind relative Bewertungen für die Reaktionsstärke und den Reaktionsbeginn, wobei die Daten jedes Stammes unter sich und zu den anderen Stämmen sowie mit den verschiedenen Substraten in Beziehung gesetzt wurden. Ein Fragezeichen bedeutet atypische oder schwer zu beurteilende Verfärbung über einen größeren p_H -Bereich. Bei Reaktionen mit Guajacol zeigten alle geprüften Stämme mit Ausnahme von *Poria vaporaria* Maxima bei 14—21 Tagen. Der *Coniophora*-Stamm *IIIo* erwies sich als besonders aktiv und repräsentierte damit auch die Aktivität der Art, soweit sich dies nach den Beobachtungen an insgesamt drei Stämmen beurteilen ließ. *Poria vaporaria* zeigte allgemein die geringste Aktivität, ergab aber bei anderen Untersuchungen mit älteren Kulturen noch eindeutige Reaktionen.

Die Optima lagen mit Werten um p_H 3 sehr tief, schlossen damit aber den fermentativen Charakter der Reaktionen nicht aus, da die p_H -Werte der Nährsubstrate dieser Pilze meist schon mit dem Einsetzen der Aktivität auf die gleiche Größenordnung abgesunken waren. Die Guajacol-Reaktion zeigte besonders bei den Stämmen *Ig* und *IIIo*, daß das p_H -Optimum artspezifisch ist. Dieser individuelle Einfluß spricht ebenfalls für eine fermentbedingte Reaktion. Das jeweilige Optimum

Tabelle 5
Reaktionen der Mycelextrakte der Braunfäulepilze mit Guajacol und Hydrochinon

Substrat	Stamm	Alter Tage	pH Kultur- filtrat	pH Mycel- extrakt	pH Optimum	Reaktions- stärke
Guajacol	<i>Merulius lacrymans</i> Ig	7	3,4	5,8	—	—
		14	2,8	5,8	2,8—3,2	++
		21	2,5	4,0	2,8	+++
		28	2,4	4,2	2,8—3,2	+
		35	2,2	3,8	2,4—4,0	(+)
	<i>Merulius silvester</i> IIc	7	3,5	5,7	—	—
		14	2,6	5,8	2,8—3,2	+++
		21	2,2	5,0	2,8—3,2	++
		28	2,0	4,3	2,8—3,2	+
		35	2,0	4,5	2,8—3,6	+
	<i>Coniophora cerebella</i> IIIo	7	3,0	5,3	2,8—3,6	+++
		14	2,1	5,6	2,8—3,6	++++
		21	1,9	5,3	3,2	++++
		28	1,9	5,7	2,8—3,6	++
		35	1,8	4,2	2,8—3,6	++
	<i>Poria vaporaria</i> IVl	7	4,0	4,9	—	—
		14				
		21	3,4	4,5	—	—
		28				
		35	2,9	5,5	2,8—3,2	+
Hydro- chinon	<i>Merulius lacrymans</i> Ig	7	3,4	5,8	—	—
		14				
		21	2,5	4,0	—	?
		28				
		35	2,2	3,8	—	?
	<i>Merulius silvester</i> IIc	7	3,5	5,7	—	—
		14				
		21	2,2	5,0	4,0	+
		28	2,0	4,3	4,0	(+)
		35	2,0	4,5	4,0	(+)
	<i>Coniophora cerebella</i> IIIo	7	3,0	5,3	3,6—4,4	++
		14	2,1	5,6	3,6—4,4	+++
		21	1,9	5,3	3,6—4,4	+++
		28	1,9	5,7	2,4—4,4	+
		35	1,8	4,2	3,2—4,4	++
	<i>Poria vaporaria</i> IVl	7	4,0	4,9	—	—
		14				
		21	3,4	4,5	—	—
		28				
		35	2,9	5,5	—	—

war reproduzierbar, was auch die Kurven der photometrischen Bestimmungen zeigten. Auch für die Unschärfen der visuellen Optimumbestimmung vor und nach Erreichen des Aktivitätsmaximums ergab das quantitative Bestimmungsverfahren eine Erklärung (siehe S. 95).

War schon die Oxydation des Guajacols durch Mycelextrakte von Braunfäulepilzen auffällig, so traf dies noch mehr für einen Teil der

Tabelle 6. Farbreaktionen der Mycelextrakte der Braunfäulepilze mit *p*-Kresol

Stamm	Alter Tage	pH Kulturfiltrat	pH Mycel-extrakt	pH Optimum	Reaktionsstärke
<i>Merulius lacrymans</i> Ic	7	3,5	5,5	—	—
	14	2,8	5,5	—	—
	21	2,5	5,0	6,8—7,2	+
	28	2,0	5,9	6,8—7,2	+++
	35				
	42	1,9	5,2	6,8—7,2	+
<i>Merulius silvester</i> IIc	7	3,5	5,7	—	—
	14	2,6	5,8	6,8—7,2	+
	21	2,2	5,0	6,8—7,2	++
	28	2,0	4,3	6,8—7,2	+++
	35	2,0	4,5	6,8—7,2	++
	42	1,9	4,5	6,8—7,2	++
<i>Coniophora cerebella</i> IIIo	7	3,0	5,3	—	?
	14	2,1	5,6	—	?
	21	1,9	5,3	3,6—4,0	+
	28	1,9	5,7	3,6—4,0	+
	35	1,8	4,2	3,6—4,0	(+)
	42				
<i>Poria vaporaria</i> IVk	7	4,3	5,5	—	—
	14	3,7	5,3	—	—
	21				
	28	3,4	4,4	—	—
	35				
	42	3,3	5,8	—	—

Tabelle 7. Fällungsreaktionen der Mycelextrakte von *Coniophora cerebella* mit *p*-Kresol

Stamm	Alter Tage	pH Kulturfiltrat	pH Mycel-extrakt	pH Optimum	Reaktionsstärke
<i>Coniophora cerebella</i> IIII	7	3,3	5,7	—	—
	14	2,5	5,2	3,2—4,0	++++
	21	2,2	5,0	3,2—4,0	++
	28	1,9	4,6	—	—
<i>Coniophora cerebella</i> IIIo	7	3,0	5,3	3,6—4,0	+
	14	2,1	5,6	3,6—4,0	++++
	21	1,9	5,3	3,6—4,0	+++
	28	1,9	5,7	—	—

p-Kresol-Reaktionen zu. Neben den zu erwartenden Verfärbungen durch Tyrosinase (Tab.6) traten auch Fällungsreaktionen (Tab.7) auf, wie sie bisher nur unter der Wirkung von Laccase und Peroxydase bekannt waren. Diese Ergebnisse konnten für *Coniophora* mehrfach reproduziert

werden. Auch bei *Merulius silvester* IIc wurde in einem Falle eine kräftige Fällungsreaktion beobachtet, die sich seitdem aber nicht durch Wiederholung sichern ließ. Auffällig war, daß es sich dabei um eine besonders gut entwickelte Hochsommer-Kulturreihe handelte, die auch außerordentlich starke Guajacolreaktionen ergab. Die Tyrosinase-Aktivität gegen p-Kresol setzte bei den *Merulius*-Stämmen im Laufe der Kulturdauer im Vergleich zu den Guajacol-Oxydationen und den p-Kresol-Fällungen deutlich später ein (Tab.6). Für *Poria* konnte bei diesen Versuchen keine Wirkung auf p-Kresol beobachtet werden. Das pH -Optimum der Tyrosinase-Aktivität der *Merulius*-Stämme stimmte mit der konstanten Spanne von pH 6,8—7,2 mit den bisherigen Beobachtungen an verschiedenen Pilz-Tyrosinasen relativ gut überein. In einigen Fällen wurde bei den *Merulius*-Stämmen nach 3—4 Wochen Kulturdauer auch eine schwache Guajacol-Oxydation bei pH 6,8—7,2 beobachtet. Hierbei war entweder in den tieferen pH -Bereichen keine Aktivität mehr festzustellen, oder aber das pH -Optimum „wanderte“ im Laufe der Reaktionszeit von den niederen zu den höheren Werten.

Coniophora bereitete bei der Beobachtung der Farbreaktionen mit p-Kresol in den ersten 14 Tagen Schwierigkeiten, da durch die gleichzeitigen Fällungsreaktionen eine eindeutige Beurteilung ausgeschlossen war. Die älteren Stadien erlaubten durch späteres Einsetzen oder Fehlen der Fällung die Feststellung, daß auch hier eine Verfärbung auftrat, die sich aber durch geringe Intensität und tiefes pH -Optimum von den Reaktionen der *Merulius*-Stämme deutlich unterschied.

Hydrochinon erwies sich als Substrat weniger geeignet (Tab.5). *Poria vaporaria* gab keine und *Merulius lacrymans* nur fragliche Reaktionen. *Merulius silvester* reagierte nur schwach aber durchgehend mit scharfem Optimum. *Coniophora cerebella* zeigte wieder die stärkste Oxydation, der optimale pH -Wert war aber nicht eindeutig zu erfassen, da die Färbung der Oxydationsprodukte in den einzelnen pH -Stufen nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verschieden war. Da aber zwischen dem pH -Bereich der Aktivität und den durch Autoxydation schwer zu beurteilenden, höheren pH -Stufen stets eine deutliche Grenze lag, konnte gesichert werden, daß die Aktivitätsspanne bei pH 4,4 als obere Grenze endete.

Von den Weißfäulepilzen sei *Pholiota destruens* vorweggenommen, da diese Art anscheinend Peroxydase bildet. Auf eine intensivere Untersuchung wurde in diesem Zusammenhang verzichtet. Mit dem Kulturfiltrat des Pilzes wurde nur die optimale Hydroperoxyd-Konzentration bestimmt, die für den Guajacol- H_2O_2 -Test angewendet wurde (vgl. S. 88). Die Reaktionen mit Guajacol allein waren bei allen anderen Kulturfiltraten und Mycelextrakten der geprüften Weiß- und Braunfäulepilze bedeutend stärker als bei H_2O_2 -Zusatz. Nur *Pholiota destruens* (Kultur-

filtrat) reagierte mit Guajacol + H_2O_2 sehr stark mit Optimum bei p_H 3,2–4,0, ergab aber mit Guajacol allein kaum eine Reaktion.

Polystictus versicolor ist ein Hauptobjekt der Pilz-Laccase-Untersuchungen, *Ganoderma lucidum* wurde neuerdings von KREBS (1960) in anderem Zusammenhang gründlich auf Phenolaseaktivität untersucht und *Pleurotus ostreatus* ist als Laccase-Bildner bekannt. Diese Arten wurden daher jeweils nur zu Vergleichszwecken bei den Untersuchungen an der Braunfäulegruppe herangezogen. Wie bei den Test-Agar-Versuchen konnten auch hier keine klaren Erkenntnisse über das Vorkommen von Tyrosinase gewonnen werden. Interessant war nur ein Ergebnis bei der Untersuchung der Mycelextrakte der beiden letztgenannten Arten. Mit Guajacol als Substrat ergaben beide Extrakte jeweils ein schwaches Optimum bei p_H 3,2–4,0 und ein zweites starkes Optimum bei p_H 4,8–6,0.

Die Gesamtergebnisse dieser Reihen-Untersuchungen ließen zumindest für *Coniophora* daran zweifeln, daß nur eine Tyrosinase-Wirkung vorlag. Um die Substratspezifität dieses Fermentes zu überprüfen, wurde nach dem gleichen Verfahren die Lösung einer Substanz untersucht, die eindeutig als Pilz-Tyrosinase deklariert war (Mushroom Tyrosinase, Worthington, Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, 10 mg zu 50 ml). Guajacol und p-Kresol wurden oxydiert, Guajacol mit einem p_H -Optimum von 7,2 an der Obergrenze des Prüfungsbereiches. In den p_H -Stufen unter 4,0 war während der Gesamtreaktionsdauer nur eine äußerst schwache Verfärbung zu beobachten. Mit p-Kresol erfolgte erwartungsgemäß nur eine langsame oxydative Farbreaktion mit Optimum bei p_H 6,8; unter p_H 4,0 zeigten sich keine Veränderungen. Der Hydrochinon-Versuch ergab unspezifische, schwache Verfärbungen, die qualitativ in den einzelnen p_H -Stufen verschieden waren. Ein Optimum war außerdem durch Autoxydation im höheren p_H -Bereich nicht eindeutig festzulegen.

Aufschlußreich ist in diesem Zusammenhang auch eine Beobachtung von SPRECHER (1961) an Mycelextrakten von *Lentinus lepideus*. Diese Art, der an Phenol-Oxydasen nur Tyrosinase zugesprochen wird, ergab außer der typischen Farbreaktion mit p-Kresol im höheren p_H -Bereich auch eindeutig eine Reaktion mit Guajacol bei tiefem p_H -Optimum.

3. Untersuchungen an Rohfermentlösungen

Um die Ergebnisse der Reihenuntersuchungen zu sichern und zu erweitern, wurden von einigen Braunfäulestämmen Rohfermentlösungen aus Mycelextrakten und teilweise auch aus Kulturfiltraten nach dem in der Methodik (siehe S. 78) beschriebenen Verfahren hergestellt. Der Ansatz der Kulturen erfolgte mit 500 ml Nährlösung B und Glucose als Kohlenstoffquelle in 3 l Erlenmeyerkolben. Die Reihen wurden jeweils zum Zeitpunkt der zu erwartenden maximalen Fermentaktivität abgeschlossen und die Mycelien von zehn Kulturen zu 120 ml Extrakt verarbeitet. Die an Proben der Extrakte und der Kulturfiltrate durchgeführten Prüfungen auf

Oxydasenaktivität waren entscheidend für die Weiterbehandlung. Bei positivem Ergebnis wurden die Ausgangslösungen zu jeweils 120 ml Roh-Ferment-Lösung pro zehn Kulturen verarbeitet. Durch die hierbei meistens erreichte höhere Fermentkonzentration konnten auch schwächere Aktivitäten erfaßt werden, die bei den Reihenuntersuchungen dem Nachweis entgangen waren. Andererseits bewirkten die veränderten Kulturbedingungen teilweise eine zeitliche Verschiebung der maximalen Aktivität und in Einzelfällen auch eine Aktivitätsverminderung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen seien in folgenden Punkten kurz zusammengefaßt:

1. Rohfermentlösungen aus Kulturfiltraten der Braunfäulepilze zeigten erwartungsgemäß keinerlei Aktivität.

2. Die Reaktionsstärke der Rohfermentlösungen aus Mycelextrakten gegenüber Guajacol und Hydrochinon wurde erst nach dreifacher Ammonsulfatfällung deutlich vermindert. Die pH -Optima der Reaktionen mit Guajacol und Hydrochinon lagen nach dem Reinigungsprozeß jeweils um etwa 0,5 pH -Einheiten tiefer. Diese Beobachtung konnte mit den Mycel-Rohfermentlösungen für die Guajacol-Reaktion photometrisch bestätigt werden (Abb.3). Mit p-Kresol traten nach der Ammonsulfatfällung keine Farb- und Fällungsreaktionen mehr auf.

3. Die Ergebnisse der Reihenuntersuchungen an Mycelextrakten der Braunfäulepilze wurden bestätigt und wie folgt erweitert: *Merulius lacrymans* Ig ergab nach 35 Tagen Kulturdauer eine starke Reaktion mit Hydrochinon. Das Aktivitätsoptimum war mit pH 3,6 eindeutig festzulegen. Die Roh-Fermentlösung des Mycelextraktes einer 56 Tage alten Kultur von *Poria vaporaria* IVI zeigte relativ starke Aktivität gegenüber Guajacol mit Optimum bei pH 2,4. Mit Hydrochinon ergab sich eine schwache, gleichmäßige Reaktion im Bereich von pH 2,4—3,6. Vor dem Reinigungsverfahren reagierte der Mycelextrakt mit p-Kresol unter deutlicher Braunrotfärbung. Das pH -Optimum ließ sich jedoch nicht scharf erfassen.

4. Photometrische Aktivitätsbestimmungen

Außer bei der photometrischen Überprüfung der oben angeführten Ergebnisse mit Rohfermentlösungen (Abb.3) wurde dieses quantitative Verfahren auch zur Sicherung der Ergebnisse mit Mycelextrakten angewandt. Zu diesem Zweck wurden Kulturen mit 150 ml Nährlösung B und Glucose als Kohlenstoffquelle in 1 Liter Erlenmeyerkolben angesetzt. In Abständen von 7 Tagen erfolgte die Aufarbeitung der Mycelien aus jeweils zehn Kolben zu insgesamt 120 ml Extrakt. Zugleich wurden mit Parallelkulturen Myceltrockengewichtsbestimmungen vorgenommen. In Tab.8 sind diese Daten und die Prüfungsergebnisse mit Guajacol als Substrat nach der Methode der Reihenuntersuchungen am Beispiel von zwei Stämmen zusammengefaßt. Die Abb.4 und 5 zeigen die entsprechenden pH -Optimum-Kurven der photometrischen Aktivitätsbestimmung. Das Reaktionsgemisch wurde bei diesen Versuchen in gleichen Verhältnissen wie bei den Reihenuntersuchungen, aber in zehnfacher Menge, angesetzt.

Der *Merulius*-Stamm *Ig* zeigte bei 7 Tagen Kulturdauer bereits geringe Aktivität, die aber noch an der Untergrenze der Meßbarkeit lag; nach 14 Tagen war das Maximum erreicht, und bei 21 Tagen waren die Werte schon wieder stark abgesunken (Abb. 4). *Coniophora cerebella* *IIIo* wies in der zweiten Woche einen sehr starken Aktivitätsanstieg auf, der sich auch in der folgenden Woche in geringerem Ausmaß fortsetzte (Abb. 5).

Die scharf begrenzten p_H -Optima im Aktivitätsmaximum stimmten bei der visuellen Beurteilung der Reihenuntersuchungen mit den photometrischen Bestimmungen exakt überein. Damit ist die Brauchbarkeit der Methodik bewiesen. Die Kurven der Aktivitätsbestimmung geben auch eine Erklärung für die Unschärfe der Optima vor Erreichen und nach Überschreiten des Maximums. Abb. 4 zeigt die Verflachung der Kurven bei abnehmender Aktivität, Abb. 5 die Verschärfung des Optimums mit der Aktivitätszunahme.

Abschließend muß noch erwähnt werden, daß die Bestimmungen der maximalen Fermentaktivität bei den gesamten Oxydasen-Untersuchungen ausschließlich auf das praktische Ziel gerichtet waren, jeweils den Zeitpunkt während der Kulturdauer zu ermitteln, in dem eine Mycelaufarbeitung zur Gewinnung von Enzymlösungen lohnend

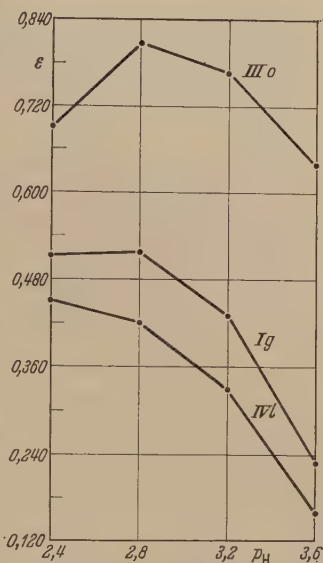


Abb. 3. p_H -Optimum-Kurven der photometrischen Aktivitätsbestimmung an Rohfermentlösungen von *Merulius lacrymans* *Ig* (35 Tage alt), *Coniophora cerebella* *IIIo* (28 Tage alt), *Poria vaporaria* *IVl* (56 Tage alt). Guajacol als Substrat, 50 mm Cuvetten, 2 Std Reaktionszeit

Tabelle 8. Guajacol-Reaktion der Mycelextrakte und Myceltrockengewichte von *Merulius lacrymans* *Ig* und *Coniophora cerebella* *IIIo*

150 ml Nährlösung B; Glucose als Kohlenstoffquelle

Stamm	Alter Tage	p_H Kulturfiltrat	p_H Mycel-extrakt	p_H Optimum	Reaktionsstärke	Mycel-trocken-gewicht mg
<i>Merulius lacrymans</i> <i>Ig</i>	7	3,9	4,7	2,4—4,0	(+)	8
	14	3,0	5,2	2,8—3,2	++	38
	21	2,7	5,3	2,4—3,2	++	70
<i>Coniophora cerebella</i> <i>IIIo</i>	7	3,3	5,7	2,4—3,6	++	21
	14	2,4	5,7	2,8—3,2	+++	300
	21	1,9	5,6	2,8	++++	765

war. Die tatsächlichen Aktivitätsverhältnisse ergeben sich erst aus der Beziehung zum Myceltrockengewicht, sind aber in diesem Zusammenhang von untergeordneter Bedeutung.

D. Diskussion

Die Lignin-Abbauversuche haben bewiesen, daß *Merulius lacrymans* und *Merulius silvester* auch nach Adaptation nicht befähigt sind, isoliertes Lignin als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Mit *Coniophora cerebella* und *Poria vaporaria* wurden zwar nur Versuchsreihen ohne Adaptation angesetzt, die erwartungsgemäß negative Befunde ergaben. In Übereinstimmung mit der bisherigen Auffassung über den

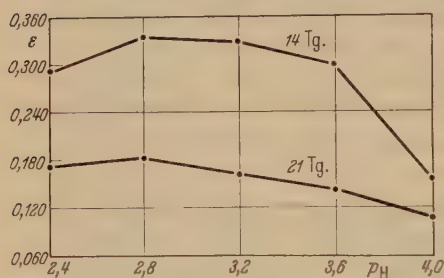


Abb. 4

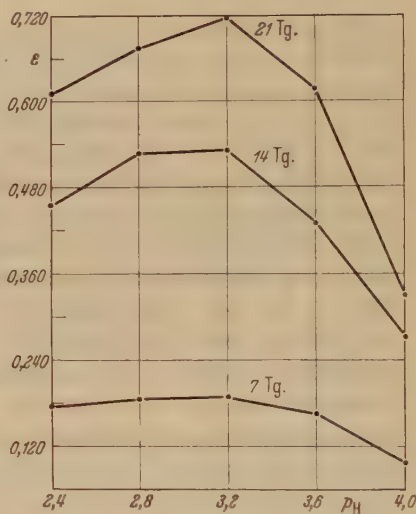


Abb. 5

Abb. 4. pu-Optimumkurven der photometrischen Bestimmung abnehmender Aktivität der Mycel-extrakte von *Merulius lacrymans* Ig. Guajacol als Substrat, 50 mm Cuvetten, 1 Std Reaktionszeit

Abb. 5. pu-Optimum-Kurven der photometrischen Bestimmung zunehmender Aktivität der Mycel-extrakte von *Coniophora cerebella* IIIo. Guajacol als Substrat, 10 mm Cuvetten, 2 Std Reaktionszeit

chemischen Ablauf einer typischen Braunfäule kann aber aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß Braunfäulepilze Lignin insgesamt nicht abbauen können. Die Möglichkeit einer chemischen Veränderung des bei der Braunfäule zurückbleibenden Lignins wird nach Besprechung der Oxydasen-Untersuchungen noch zu diskutieren sein. Die Befunde elektronenmikroskopischer Untersuchungen an braunfaulem Holz (MEIER 1955) und die eigenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Angaben von FISCHER (1953). FISCHER (1957) erwähnt die Möglichkeit, daß die Entwicklung des Hausschwamms mit Phenollignin als Kohlenstoffquelle gegebenenfalls ausschließlich auf die Nutzung nicht quantitativ entfernten Äthanol zurückzuführen sein könnte. Diese Frage wäre an Parallelkulturen mit einem Äthanolzusatz ohne Phenollignin bei sonst gleicher Behandlung zu klären gewesen.

Das üppige Mycelwachstum einer 22 Tage alten Phenollignin-Agarkultur des Hausschwammes ohne Adaptation (siehe Abbildung bei FISCHER 1953) kann nicht nur durch die Verwertung restlichen Äthanol und aus den Reserven des Impfmateri als zustande gekommen sein. Vermutlich enthielt das verwendete Phenollignin noch nutzbare Mengen an Kohlenhydratverunreinigungen. Die Feststellung FISCHERS, daß „*Merulius domesticus*“ fähig ist, Lignin zu verwerten, wenn dieser aromatische Komplex in eine lösliche Form übergeführt worden ist“, hat schon mehrfach Eingang in die Literatur gefunden (MEIER 1955; LOHWAG 1955; JENSEN 1959; LYR u. ZIEGLER 1959), kann aber in diesem Zusammenhang nicht nur hinsichtlich der Lignin-Verwertung durch den Hausschwamm, sondern auch in bezug auf die Löslichkeit von Phenollignin nicht kritiklos hingenommen werden. BRAUNS (1952) bezeichnet den Ligninanteil, der durch Extraktion des Holzes mit Alkohol, Dioxan oder einem anderen geeigneten, organischen Lösungsmittel ohne Zusatz eines Katalysators gewonnen werden kann, als „isoliertes natives Lignin“. FREUDENBERG (1954, 1955) nennt diesen Anteil „lösliches Lignin“ im Gegensatz zur Hauptmasse, die ungelöst im Holz zurückbleibt. Selbstverständlich bezieht sich diese Bezeichnung nicht auf Wasserlöslichkeit. Zu den von BRAUNS (1952) als „Organosolv Lignins“ zusammengefaßten Ligninderivaten zählt auch Phenollignin. Wie der Name dieser Gruppe sagt, ist hier ebenfalls nicht an eine Löslichkeit in Wasser gedacht. Phenollignin ist nicht wasserlöslich. Die Angabe, daß dieses Ligninpräparat in Wasser gelöst wurde (FISCHER 1953), hat FISCHER (1957) dahingehend berichtet, daß nicht eine Lösung, sondern eine Suspension hergestellt wurde.

Bei den eigenen Adaptationsversuchen mit *Merulius*-Stämmen wurde festgestellt, daß die ligninhaltigen Kulturen der 1. Passage besser entwickelt waren als die Glucose-Kontrollen mit gleichem Kohlenstoffgehalt. Diese Beobachtung ist im Sinne des „synergistischen Effekts“ nach GOTTLIEB, DAY u. PELCZAR (1950) zu deuten.

Die Ergebnisse der Lignin-Abbauversuche mit Weißfäulepilzen von DAY, PELCZAR u. GOTTLIEB (1949), GOTTLIEB, DAY u. PELCZAR (1950) sowie PELCZAR, GOTTLIEB u. DAY (1950) sind durch Methodik und Kontrollen weitgehend gesichert. Das von diesen Autoren angewandte Auswahlverfahren zur Erfassung der aktivsten Ligninzer-setzer unter 35 Weißfäulestämmen führte zu dem Erfolg, daß zwei zur Adaptation befähigte Arten herausgegriffen werden konnten. Bei den Adaptationsversuchen wäre zur Beurteilung der Normalentwicklung mit gut verwertbarer Kohlenstoffquelle der Ansatz weiterer Glucose-Kontrollen mit dem den Lignin-Kulturen entsprechenden vollen Kohlenstoffgehalt zweckmäßig gewesen.

Ein Vergleich der Ergebnisse eigener Lignin-Abbauversuche mit *Polystictus versicolor* XIe mit den Befunden von PELCZAR, GOTTLIEB u. DAY (1950) sowie DION (1952) zeigt, daß sich verschiedene Stämme dieser Art nicht nur in der Lignin-Verwertung sondern auch in der Fähigkeit zur Nutzung anorganischer Stickstoffquellen unterscheiden. Die Weißfäulepilze sollten bei den eigenen Untersuchungen nur zum

Vergleich mit den Ergebnissen der Braunfäulegruppe herangezogen werden. Eine Auswahl besonders aktiver Stämme wurde daher auch nicht getroffen.

Die von VAN VLIET (1954) bei den Lignin-Abbauversuchen mit *Polystictus versicolor* und *Poria subacida* angewandte Methodik weist einige Fehlerquellen auf. Eine quantitative Entfernung des zur Lösung des Lignins verwendeten Alkohols scheint bei dem Durchlüftungsverfahren ohne Druckminderung und bei Normaltemperatur nicht gewährleistet. Der Ansatz gleichartig behandelter Kontrollen mit entsprechendem Äthanolzusatz wäre hier erforderlich gewesen. Die Mycelien wurden vor der Trockengewichtsbestimmung nicht mit einem organischen Lösungsmittel behandelt, so daß möglicherweise adsorbiertes Lignin (vgl. GOTTLIEB u. PELCZAR 1951) mitgewogen wurde. Die Temperatur von 60° C und die Zeitspanne von 3 Std für das Trocknungsverfahren lassen einen noch erheblichen Wassergehalt der Mycelien bei der Wägung annehmen.

Die Ergebnisse der eigenen Ligninabbauversuche mit Weißfäulepilzen sind durchaus vergleichbar mit den von DAY, PELCZAR u. GOTTLIEB erzielten Ergebnissen, wenn folgende Punkte berücksichtigt werden: 1. Die geprüften Stämme wurden nicht durch Vorversuche ausgewählt. 2. Stickstoff wurde nur als anorganische Verbindung geboten (NH_4NO_3). 3. Die Pilze wurden ohne Adaptation auf das Substrat mit Lignin als alleiniger Kohlenstoffquelle angesetzt. 4. Lignin wurde in den meisten Versuchen als Phenollignin geboten, das vermutlich noch höher kondensiert ist als das natürliche Lignin. 5. Bei der Mycelgewichtsbestimmung wurden mit einer Trocknungstemperatur von 95° C wesentlich schärfere Bedingungen eingehalten.

Dem teilweise starken Abbau des Lignins durch Weißfäulepilze im Holz steht die schlechtere Verwertung des isolierten Lignins unter Kulturbedingungen gegenüber. Dieses Problem wird im Anschluß an die Diskussion der Ergebnisse der Oxydasenuntersuchungen besprochen werden.

LINDBERG u. HOLM (1952) erhielten mit Rohenzymlösungen, die aus wäßrigen Mycelextrakten durch Ammonsulfatfällung, Lösung des Niederschlages in wenig Wasser und anschließende Dialyse gewonnen wurden, zum Teil auffallend tiefe pH-Optima der Aktivität intracellulärer Oxydasen gegenüber Brenzcatechin als Substrat. Die untersuchten Hymenomyceten zählten zu den ökologischen Gruppen der Streuzersetzer, Coprophilen und Mycorrhiza-Bildner. Die Aktivität war teils auf Tyrosinase-Wirkung, teils auf die Wirkung intracellulärer Laccase zurückzuführen.

Die eigenen Untersuchungen mit Mycelextrakten und aus diesen gewonnenen Rohfermentlösungen zeigten, daß in den Mycelien von Braunfäulepilzen anscheinend außer Tyrosinase noch eine zweite, laccaseartige, intracelluläre Oxydase gebildet wird, die gegenüber den geprüften Substraten ebenfalls auffallend tiefe pH-Optima zeigte. Nicht fermentbedingte Reaktionen unter der katalytischen Wirkung von Schwermetallionen können beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen noch nicht völlig ausgeschlossen werden, sind aber unwahr-

scheinlich, da Kontrollen mit der verwendeten Nährlösung keine Veränderung im Laufe der Reaktionszeit zeigten. Außerdem sprechen die unterschiedlichen p_H -Optima der geprüften Arten gegen eine solche Wirkung. Nach GRAUBARD (1939) kann auch ein System Cytochrom-Cytochromoxydase als Agens ausgeschlossen werden.

Bei den Untersuchungen an Mycelextrakten der Braunfäulepilze gaben schon die Reaktionen mit Guajacol als Substrat einen Hinweis auf die Wirkung zweier intracellulärer Oxydasen. Während der ersten 3—4 Wochen Kulturdauer lagen die p_H -Optima bei Werten um p_H 3. In älteren Kulturen der *Merulius*-Stämme war ein Optimum bei p_H 6,8 bis 7,2 festzustellen. Das teilweise beobachtete „Wandern“ des Optimums während der Reaktionszeit von tiefen zu höheren p_H -Werten dürfte ebenfalls auf zwei verschiedenen Fermentaktivitäten beruhen. Nach den Untersuchungsergebnissen mit Pilz-Tyrosinase (Mushroom-Tyrosinase, Worthington) muß Guajacol in den Substratbereich der Tyrosinase einbezogen werden (vgl. S. 93). Das Optimum der Reaktion liegt bei Werten um p_H 7. Die Tyrosinase-Aktivität der *Merulius*-Stämme gegenüber Guajacol setzte mit hohem p_H -Optimum im Laufe der Kulturdauer später ein und die Reaktion selbst verlief langsamer als die Guajacol-Oxydation bei tiefen p_H -Werten durch das laccaseartige Endoferment. Die Verschiebung des Optimums während der Reaktionszeit kann also mit einer rasch einsetzenden, aber insgesamt schwachen Reaktion bei tiefen p_H -Werten und einer stärkeren, aber langsam verlaufenden Reaktion im höheren p_H -Bereich erklärt werden. Für diese Auffassung spricht auch die Tatsache, daß solche Beobachtungen nur an Mycelextrakten von älteren Kulturen gemacht werden konnten, in denen die Tyrosinase-Aktivität ansteigend oder maximal war, während die Aktivität des im tieferen p_H -Bereich wirkenden Fermentes das Maximum überschritten hatte.

Die Beobachtung, daß bei der Guajacol-Reaktion der Mycelextrakte laccasebildender Weißfäulepilze (*Ganoderma lucidum XIVg* und *Pleurotus ostreatus XVIIr*) ebenfalls 2 p_H -Optima zu erkennen waren, läßt auf das Vorhandensein von intracellulären und extracellulären Laccasen schließen, die sich in dieser Hinsicht unterscheiden.

Die Fällungsreaktion der Mycelextrakte von *Coniophora cerebella* mit p-Kresol spricht noch deutlicher als die Guajacol-Reaktion für eine intracelluläre Oxydase vom Laccase-Typus. Einschränkend muß hier gesagt werden, daß es bei den bisherigen Untersuchungen noch nicht gelungen ist, diese Reaktion nach einem Reinigungsprozeß zu reproduzieren. Vermutlich ist gerade die Methode der Ammonsulfatfällung für diesen Zweck ungeeignet. Zur Klärung dieser Frage werden verschiedene Isolierungsverfahren für das Ferment zur Zeit erprobt.

Außer bei *Coniophora cerebella* konnte die Fällungsreaktion mit p-Kresol nur in einem Falle an einem Mycelextrakt von *Merulius silvester IIc* beobachtet werden. Da *Coniophora cerebella* aber mit allen Substraten stärkere Reaktionen zeigte als die geprüften anderen Braunfäulearten, kann es sich hier möglicherweise nur um Aktivitätsunterschiede handeln.

Bei den *Merulius*-Stämmen setzte die Tyrosinase-Aktivität gegenüber p-Kresol wie bei Guajacol erst nach 3—4 Wochen Kulturdauer ein, war dann aber sowohl nach der Farbe der Oxydationsprodukte als auch nach dem pH -Optimum typisch für die Wirkung dieses Fermentes. *Poria vaporaria* zeigte mit Fermentlösungen aus den Mycelien älterer Kulturen deutliche Aktivität gegenüber Guajacol und Hydrochinon im tieferen pH -Bereich; die p-Kresol-Reaktionen lassen aber keinen endgültigen Schluß auf das Vorhandensein von Tyrosinase zu.

Die geringen Verfärbungen, die an Mycelextrakten von *Coniophora cerebella* bei schwacher oder fehlender Fällungsreaktion mit p-Kresol beobachtet wurden, können nur mit Vorbehalt auf eine Tyrosinase-Wirkung zurückgeführt werden, zumal das pH -Optimum sehr tief lag.

Hydrochinon erwies sich als Substrat nicht sehr geeignet. Es wurde zwar eindeutig für alle geprüften Braunfäulearten eine Oxydation der Substanz durch die Mycelextrakte im tiefen pH -Bereich festgestellt, die gut mit den Beobachtungen bei Verwendung von Guajacol als Substrat und bei den Fällungsreaktionen mit p-Kresol übereinstimmte. Auf die Schwierigkeiten einer exakten pH -Optimumbestimmung bei dieser Reaktion wurde aber bereits hingewiesen. Sofern nicht hochgereinigte Fermentlösungen verwendet werden, läßt sich die Oxydation von Hydrochinon auch nicht zur Unterscheidung von Laccase und Tyrosinase heranziehen, da Spuren von Brenzcatechin genügen, um auch eine Reaktion mit Tyrosinase in Gang zu bringen (GREGG u. NELSON 1940).

Einige Untersuchungen, über die gesondert berichtet wird, zeigten Reaktionen der Mycelextrakte von Braunfäulepilzen mit weiteren Substraten wie α -Naphthol und p-Phenylendiamin, die ebenfalls auf die Wirkung eines laccaseartigen Endofermentes schließen lassen.

Die Verschiebung der pH -Optima nach tieferen Werten im Laufe des Reinigungsprozesses der Fermentlösungen konnte zwar durch photometrische Bestimmungen exakt erfaßt werden. Es bleibt aber noch zu prüfen, ob dieser Effekt nicht auf die Addition geringer Fehlerquellen (Optimum zwischen den Pufferstufen, pH -Verschiebung während der Reaktionszeit) zurückzuführen ist. Diese Frage wird durch stärkere Pufferung des Reaktionsgemisches und Verwendung von Puffern mit einer Abstufung von 0,2 pH -Einheiten zu klären sein.

Die photometrischen Bestimmungen an Mycelextrakten haben gezeigt, daß einerseits ein scharfes pH -Optimum nur im Aktivitätsmaximum zu

erfassen ist, und daß andererseits Aktivitätsmessungen im Zeitpunkt des Maximums bei dem steilen Abfall der Kurven eine exakte Optimumbestimmung voraussetzen, wenn sie zu vergleichbaren Werten führen sollen. Über Ergebnisse manometrischer Aktivitätsbestimmungen wird später berichtet.

Da bei allen bisherigen Oxydasenversuchsreihen mit Flüssigkeitskulturen Nährlösung B mit Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde, können die Gesamtergebnisse auch nur auf dieses Substrat bezogen werden.

Test-Agar-Versuche zur qualitativen Prüfung auf das Vorhandensein extracellulärer Oxydasen können nur zur Vororientierung dienen. Der Ansatz von Tyrosin-Agar erübrigt sich, da ein negativer Befund mit diesem Substrat keinen endgültigen Schluß auf das Fehlen von Tyrosinase auf Grund des intracellulären Charakters des Fermentes zuläßt. Die „Senkrecht-Agar“-Methode mit Tannin oder Guajacol als Substrat ermöglicht aber nahezu quantitative Untersuchungen zum Vergleich der Oxydasenaktivität verschiedener Weißfäulestämmen. Pilze, die Pigmente in größerem Ausmaß in das Substrat ausscheiden, sind für derartige Untersuchungen nicht geeignet.

Das Vorkommen einer intracellulären Laccase bei Braunfäulepilzen könnte die chemischen Veränderungen des Lignins erklären, die von verschiedenen Autoren bei diesem Fäuleprozeß festgestellt wurden (siehe S. 73). Wenn in hochgradig braunfaulem Holz nach Abbau der Kohlenhydrate ein solches Ferment durch Autolyse aus den Mycelien freigesetzt wird, besteht die Möglichkeit eines oxydativen Angriffes auf das Lignin.

Nach FREUDENBERG, HARKIN, REICHERT u. FUKUZUMI (1958) und FREUDENBERG (1959) beschränkt sich die Wirkung der Oxydasen beim Aufbau des Lignins aus p-Hydroxy-zimtalkoholen auf die Dehydrierung, die am Phenolhydroxyl ansetzt. Alle übrigen Reaktionen laufen ohne Fermenteinwirkung ab. Die Radikale stabilisieren sich hauptsächlich durch Dimerisation zu sekundären Lignin-Bausteinen. Die enzymatische Dehydrierung kann hier erneut einsetzen und zu weiterer Polymerisation überleiten. Außer durch Dehydrierungspolymerisation baut sich das Lignin auch durch Addition der Zimtalkohole an intermediär gebildete Chinonmethode auf, wobei weitere Ätherbindungen entstehen. Während nach dieser Auffassung der Aufbau des Lignins aus den primären Bausteinen unter der Wirkung nur eines Fermentsystems vom Oxydasentypus möglich ist, dürfte der biologische Abbau des hochpolymeren Lignins nicht nur auf einer Oxydasenwirkung beruhen (vgl. LINDBERG 1955, LYR u. ZIEGLER 1959, PHAFF 1959). Bei der Spaltung der Ätherbindungen ist an eine Beteiligung von Hydrolasen zu denken. Wo und

wann die Oxydasen im Verlaufe des Abbaues einwirken, ist nicht bekannt. Es ist denkbar, daß Laccase und Peroxydase, dieselben Enzyme, welche die Dehydrierungspolymerisation beim Ligninaufbau einleiten, auch den gegenläufigen Prozeß einer Depolymerisation beim Abbau katalysieren. Dieser Vorgang könnte aber allenfalls wieder bis zu monomeren Einheiten führen. Über eine oxydative Spaltung der C-C-Bindung aromatischer Ringe unter der Wirkung der beiden Fermente wurde, soweit bekannt, bisher noch nicht berichtet. Falls der Ligninabbau durch Weißfäulepilze überhaupt soweit voranschreitet, muß die Beteiligung weiterer, ringspaltender Fermente angenommen werden. Über den Abbau aromatischer Verbindungen durch Bakterien liegt eine ganze Reihe von Arbeiten vor (KILBY 1948, PARR, EVANS u. EVANS 1949, STANIER u. INGRAHAM 1954, MACDONALD, STANIER u. INGRAHAM 1954, SISTROM u. STANIER 1954, WIELAND, GRISS u. HACCUS 1958). Auch für *Aspergillus niger* wurden solche Abbauprozesse nachgewiesen (FRIEDRICH 1956). Über die Verwertung von Lignanen durch Mikroorganismen berichten KONETZKA, PELCZAR u. GOTTLIEB (1952) sowie TABAK, CHAMBERS u. KABLER (1959). Übereinstimmend wird in verschiedenen dieser Veröffentlichungen ein Abbauweg aromatischer Verbindungen angegeben, der über o-Benzochinon-Derivate zu β -Keto adipinsäure als erster aliphatischer Stufe führt. Nicht ganz aus der Diskussion auszuschließen wäre möglicherweise ein der „Aromatisierung“ gegenläufiger Abbauprozess. Weder für den einen noch für den anderen Vorgang finden sich aber bisher Angaben in der spärlichen Literatur über Versuche zum Abbau von Ligninmodellsubstanzen durch Basidiomyceten (vgl. FÄHRÆUS 1949) und über Lignin-Abbauversuche mit Fermentpräparaten dieser Pilze.

Aus der hier angestellten Betrachtung über die am mikrobiologischen Abbau des Lignins beteiligten Fermente ergibt sich auch eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Ergebnisse der enzymatischen Abbauversuche an isoliertem Lignin (siehe S. 75). Soweit hierzu hochgereinigte Oxydasenpräparate verwendet wurden, kann der Abbauprozess nach der oben dargelegten Auffassung allenfalls zu einem Gleichgewicht des oxydativen Abbaues und der Polymerisation führen, da der weitere Abbau durch die Entfernung anderer notwendiger Fermentsysteme blockiert ist. Die positiven Befunde bei solchen Versuchen lassen umgekehrt darauf schließen, daß in diesen Fällen eine „Verunreinigung“ durch weitere Fermente vorlag, die zwar nicht beabsichtigt, aber wirkungsvoll war.

Entsprechende Gesichtspunkte ergeben sich für den mäßigen Abbau isolierter Ligninpräparate durch Weißfäulepilze in Kultur. Gewisse Bestandteile des Nährsubstrates wie z.B. Schwermetallionen könnten

eine Hemmung weiterer Fermentsysteme bewirken, die außer den Oxydasen am Ligninabbau beteiligt sind.

Es bleibt noch die Möglichkeit zu diskutieren, daß der Abbau des Lignins insgesamt als ein energieverbrauchender Prozeß zu betrachten ist, der nur ablaufen kann, wenn gleichzeitig, wie im Holz, besser verwertbare, energieliefernde Kohlenstoffquellen vorhanden sind (vgl. CARTWRIGHT u. FINDLAY 1946; NORD u. DE STEVENS 1958). Diese Auffassung hat sehr viel Wahrscheinlichkeit für sich. Brauns-Lignin stellt nach FREUDENBERG (1955) nur eine niedermolekulare Fraktion des Gesamtlignins dar, die Lignane enthält. Die Nutzung dieser wahrscheinlich auch in hochgereinigten Ligninpräparaten noch enthaltenen Substanzen durch Weißfäulepilze mit oder ohne Adaptation würde alle bisherigen Angaben über die in keinem Falle ausgesprochen gute Mycelentwicklung mit Brauns-Lignin als alleiniger Kohlenstoffquelle erklären. Sämtliche Ergebnisse mit Phenollignin sind aus mehrfach erwähnten Gründen vorsichtig zu beurteilen. Abbauprobversuche mit Björkman-Lignin könnten möglicherweise weitere Aufschlüsse ergeben. Eine endgültige Entscheidung über die Nutzung isolierter Ligninpräparate durch Weißfäulepilze wird erst dann gefällt werden können, wenn auch die Konstitution des Lignins aufgeklärt ist und keine Zweifel über die Identität des zu Abbauprobversuchen verwendeten Präparates mit dem natürlichen Lignin mehr bestehen.

Zusammenfassung

1. Nach den Ergebnissen der Ligninabbauversuche ist *Merulius lacrymans* als typischer Braunfäulepilz entgegen den Angaben von FISCHER (1953) nicht befähigt, Phenollignin als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Brauns-Lignin und Phenollignin werden von Braunfäulepilzen nicht angegriffen und von Weißfäulepilzen nur in geringem Ausmaß verwertet.

2. Die Mycelextrakte aller geprüften Braunfäulepilze (*Merulius lacrymans*, *M. silvester*, *Coniophora cerebella*, *Poria vaporaria*) oxydierten Guajacol. Das Aktivitätsmaximum war unter den angewandten Kulturbedingungen bei den *Merulius*-Arten und bei *Coniophora cerebella* nach 2–3 Wochen erreicht. Das Optimum der Reaktion lag bei Werten um pH 3. *Poria vaporaria* setzte mit der Aktivität später ein und zeigte insgesamt schwächere Reaktionen als die anderen Arten, aber ebenfalls mit tiefem pH-Optimum.

3. Mycelextrakte älterer Kulturen von *Merulius lacrymans* und *M. silvester* ergaben eine weitere Reaktion mit Guajacol, deren Optimum bei pH 7 lag. Die Ergebnisse von Vergleichsuntersuchungen mit reiner Pilztyrosinase zeigten, daß die Oxydation von Guajacol in diesem pH-Bereich auf Tyrosinase-Wirkung beruht.

4. Mit p-Kresol ergaben die Mycelextrakte von *Coniophora cerebella* eine Fällungsreaktion. Das Optimum lag bei p_H 3—4. Tyrosinase-Aktivität gegenüber p-Kresol mit Optimum bei p_H 7 ließ sich eindeutig nur für die beiden *Merulius*-Arten nachweisen.

5. Die Reaktionen der Mycelextrakte aller geprüften Braunfäule-Arten mit Hydrochinon weisen ebenfalls auf eine Fermentaktivität mit einem Optimum im Bereich von p_H 3—4 hin.

6. Diese Ergebnisse sprechen für ein Laccase-artiges Endoferment im Mycel von Braunfäulepilzen, das zusammen mit Tyrosinase auftreten kann.

7. Die Fehlerquellen bei Abbauprobungen mit isoliertem Lignin und die eventuell auf den Lignananteil beschränkte Nutzung von Brauns-Lignin durch Weißfäulepilze, ferner die Beteiligung verschiedener Fermentssysteme am Ligninabbau sowie die Möglichkeit einer oxydativen Veränderung des Lignins bei der Braunfäule werden diskutiert.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. HANS KÜHLWEIN, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die stete Förderung bei ihrer Durchführung.

Das Landesgewerbeamt Baden-Württemberg hat die Untersuchungen finanziell unterstützt, wofür an dieser Stelle unser besonderer Dank zum Ausdruck gebracht wird.

Literatur

- APENITIS, A. H., H. ERDTMAN and B. LEOPOLD: Svensk Kem. Tidskr. **63**, (9) 195 (1951).
- BAVENDAMM, W.: Z. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz **38**, 257 (1928a).
- BAVENDAMM, W.: Zbl. Bakt., II. Abt. **76**, 172 (1928b).
- BJÖRKMAN, A.: Nature (Lond.) **174**, 1057 (1954).
- BOIDIN, J.: Rev. mycol. **16**, 173 (1951).
- BRAUNS, F. E.: J. Amer. chem. Soc. **61**, 2120 (1939).
- BRAUNS, F. E.: The Chemistry of Lignin. New York: Acad. Press 1952.
- CAMPBELL, W. G.: Biochem. J. **26**, 1829 (1932).
- CARTWRIGHT, K. St. G., and W. P. K. FINDLAY: Decay of Timber and its Prevention. His Majesty's Stationary Office, London (1946).
- DAVIDSON, R. W., W. A. CAMPBELL and D. J. BLAISDELL: J. Agr. Res. **57**, 683 (1938).
- DAY, W. C., M. J. PELCZAR and S. GOTTLIEB: Arch. Biochem. **23**, 360 (1949).
- DE STEVENS, G., and F. F. NORD: Fortschr. chem. Forsch. **3**, 70 (1954).
- DION, W. M.: Canad. J. Bot. **30**, 9 (1952).
- ETHERIDGE, D. E.: Canad. J. Bot. **35**, 595 (1957).
- FÄHRRAEUS, G.: Ann. Roy. Agr. Coll. Sweden **16**, 618 (1949).
- FÄHRRAEUS, G.: Atti del VI. Congresso internazionale di Microbiologia. Vol. V, 130 (1953).
- FALCK, R.: Ber. dtsch. bot. Ges. **44**, 652 (1926).
- FALCK, R., u. W. HAAG: Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 225 (1927).

- FISCHER, G.: Diss. T. H. Stuttgart 1952.
- FISCHER, G.: Arch. Mikrobiol. **18**, 397 (1953).
- FISCHER, G.: Persönl. Mitteilung 1957.
- FREUDENBERG, K.: Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **11**, 43 (1954).
- FREUDENBERG, K.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Herausg. von PAECH, K., u. M. V. TRACEY, III, 499. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.
- FREUDENBERG, K.: Chem. Ber. **92**, 89 (1959).
- FREUDENBERG, K., J. HARKIN, M. REICHERT u. T. FUKUZUMI: Chem. Ber. **91**, 581 (1958).
- FRIEDRICH, H.: Arch. Mikrobiol. **25**, 297 (1956).
- FUKUZUMI, T.: J. Japan. Forest. Soc. **35**, (4) 139 (1953).
- GOTTLIEB, S., W. C. DAY and M. J. PELCZAR: Phytopathology **40**, 926 (1950).
- GOTTLIEB, S., and H. J. GELLER: Science **110**, 189 (1949).
- GOTTLIEB, S., and M. J. PELCZAR: Bact. Rev. **15**, 55 (1951).
- GRAUBARD, M.: Enzymologia **5** (6), 332 (1939).
- GREGG, D. C., and J. M. NELSON: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2510 (1940).
- HIGUCHI, T.: J. Japan. Forest. Soc. **35** (3), 77 (1953).
- HIGUCHI, T., J. KAWAMURA and H. KAWAMURA: J. Japan. Forest. Soc. **37**, (7) 298 (1955).
- HIGUCHI, T., and K. KITAMURA: J. Japan. Forestry Soc. **35** (11), 350 (1953).
- HUBERT, E. E.: J. Agric. Res. **29**, 523 (1924).
- JENSEN, H. L.: Handb. Pflanzenphysiologie, XI, 725 (1959).
- JÖRGENSEN, E., and K. VEILBY: Physiol. Plantarum **6**, 533 (1953).
- KILBY, B. A.: Biochem. J. **43**, V—VI (1948).
- KLEIN, G.: Handb. Pflanzenanalyse, 3. Bd. Spezielle Analyse, 2. Teil, Organische Stoffe, II, 1467 (1932).
- KONETZKA, W. A., M. J. PELCZAR and S. GOTTLIEB: J. Bact. **63**, 771 (1952).
- KREBS, G.: Noch nicht veröffentlicht (1960).
- LAW, K.: Ann. Bot. N. S. **14**, 69 (1950).
- LAW, K.: Ann. Bot. N. S. **19**, 561 (1955).
- LEOPOLD, B.: Svensk. Kem. Tidskr. **63**, 260 (1951).
- LINDBERG, G.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde **69**, (114) 142 (1955).
- LINDBERG, G., and G. HOLM: Physiol. Plantarum **5**, 100 (1952).
- LOHWAG, K.: Erkenne und bekämpfe den Hausschwamm und seine Begleiter! Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Mariabrunn in Wien, Bd. 3. Wien, München: Verlag Georg Fromme u. Co. 1955.
- LYR, H.: Planta (Berl.) **46**, 408 (1955).
- LYR, H.: Planta (Berl.) **48**, 239 (1956).
- LYR, H.: Naturwissenschaften **44**, 235 (1957a).
- LYR, H.: Biochem. Z. **329**, 91 (1957b).
- LYR, H.: Planta (Berl.) **50**, 359 (1958).
- LYR, H., u. H. ZIEGLER: Phytopath. Z. **35**, 173 (1959).
- MAC DONALD, D. L., R. Y. STANIER and J. L. INGRAHAM: J. biol. Chem. **210**, 809 (1954).
- MASON, H. S., and M. CRONYN: J. Amer. chem. Soc. **77**, 491 (1955).
- MEIER, H.: Holz als Roh- und Werkstoff **13**, 323 (1955).
- NOBLES, K.: Canad. J. Bot. **36**, 91 (1958).
- NORD, F. F., and G. DE STEVENS: Handb. Pflanzenphysiol. X, 389 (1958).
- NORD, F. F., and L. J. SCIARINI: Arch. Biochem. **9**, 419 (1946).
- PARR, W. H., R. A. EVANS and W. C. EVANS: Biochem. J. **45**, 29 (1949).

- PELCZAR, M. J., S. GOTTLIEB and W. C. DAY: Arch. Biochem. **25**, 449 (1950).
PHAFF, H. J.: Handb. Pflanzenphysiol. XI, 82 (1959).
PRESTON, A., and E. I. MC. LENNAN: Ann. Bot., N. S. **12**, 53 (1948).
SCHWALBE, C., and A. EKENSTAM: Cellulosechemie **8**, 13 (1927).
SISTROM, W. R., and R. Y. STANIER: J. biol. Chem. **210**, 821 (1954).
SPRECHER, E.: Arch. Mikrobiol. **38**, (1961). (Im Druck.)
STANIER, R. Y., and J. L. INGRAHAM: J. biol. Chem. **210**, 799 (1954).
TABAK, H. H., C. W. CHAMBERS and P. W. KABLER: J. Bact. **78**, 469 (1959).
VAN VLIET, W. F.: Biochim. biophys. Acta **15**, 211 (1954).
WIELAND, TH., G. GRISS u. B. HACCUS: Arch. Mikrobiol. **28**, 383 (1958).
ZOBERST, W.: Arch. Mikrobiol. **18**, 1 (1952).

From the Department of Bacteriology Rutgers, the State University
New Brunswick, New Jersey, USA

Effect of Nutritional Deficiencies on Synthesis of the Inducible Malic Enzyme of *Lactobacillus Plantarum*

By

HELENE A. NATHAN* **

With 4 Figures in the Text

(Eingegangen am 8. September 1960)

In 1950 BLANCHARD et al. noted that suspensions of *Lactobacillus arabinosus (plantarum)* 17-5 which had been grown in a biotin-deficient medium could only synthesize meager amounts of its inducible malic enzyme. The addition of biotin to the induction mixture restored ability to synthesize malic enzyme by the deficient cells. Because biotin had not been found to be a physical part of the enzyme (OCHOA et al. 1947), it was suggested that biotin was involved in the synthesis of the enzyme rather than in its function. While it was further suggested that the biotin effect was unique (BLANCHARD et al. 1950), this seemed unlikely. As *L. plantarum* requires, exogenously, 6 other vitamins in addition to biotin, the effect of vitamin deficiencies on subsequent malic enzyme synthesis could be easily studied.

One would suppose that vitamin-deficient cells would show impaired ability to synthesize malic enzyme, which indeed was found in some cases, but a deficiency of *p*-aminobenzoic acid (PAB) enhanced the ability to form malic enzyme. This unusual phenomenon is detailed here.

Methods

The organism used for these experiments was *Lactobacillus plantarum* 17-5, ATCC 8014. Stock cultures were kept as stabs in a medium composed of yeast extract, 1.0%; glucose, 1.0%; and agar, 1.5%. Inocula for experimental cultures were grown in the medium minus the agar. One drop of an 18 hour culture was used to inoculate 100 ml of experimental culture.

Nutritionally deficient cells were prepared by growing *L. plantarum* in a modified WRIGHT and SKEGGS (1944) medium with either biotin, thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin, pantothenate, PAB, adenine, guanine, or uracil limiting.

After cells were grown for 15—18 hours at 36° C., they were harvested by centrifugation, washed with distilled water and resuspended in distilled water. The

* Present addresses: Haskins Laboratories, 305 East 43 Street, New York 17, N. Y.; Dept. of Biological Sciences, Goucher College, Towson 4, Md.

** I thank Professor W. W. UMBREIT for his continued interest during these studies and Park-Davis, Inc. and Smith, Kline and French respectively for chloramphenicol and chlorpromazine.

suspension was adjusted so that a 1 : 10 dilution had an optical density of 0.4 when measured in a Klett-Summerson colorimeter equipped a No. 42 (420 m μ) filter.

Amount of malic enzyme synthesized was assessed manometrically by CO₂ evolution from the decarboxylation of malic acid, a method previously outlined (BLANCHARD et al. 1950). For these manometric measurements, each Warburg vessel contained: 0.4 ml of the growth medium minus all vitamins and nucleic acid derivatives; 1.2 ml of 0.04 M PO₄ buffer, p_H 5.6; MnCl₂ (6.0 μ M); MgSO₄ · 7H₂O (6.0 μ M); DL-malate (0.23 mM); and in the side arm, 0.3 ml of cell suspension. The final volume was 3.0 ml. When desired, 50 μ g supplements of individual vitamins were added. That is, cells were grown in the absence of malic acid (which induces the formation of malic enzyme), the washed cells then were placed in the Warburg vessels and supplied with the medium noted (which allows synthesis of malic enzyme but not cell replication).

Results

Cells deficient in either biotin, nicotinic acid, or thiamine only synthesized meager amounts of malic enzyme. A marked improvement of enzyme synthesis occurred when the deficient vitamin was included in the Warburg-incubation mixture. Results with pyridoxine-deficient cells were similar, although improvement of enzyme synthesis upon addition of pyridoxine was not as good. Cells deficient in riboflavin had an impairment in ability to synthesize malic enzyme which was not relieved by the addition of riboflavin. Results with pantothenate-deficient cells were not as clear: sometimes there was a slight reduction and at other times a slight stimulation of ability to synthesize malic enzyme.

The effect of PAB-deficiency was strikingly different: deficient cells synthesized more malic enzyme than did normal cells (Fig. 1). This unusual system was studied further.

Removal of PAB from the growth medium (without further supplementation) could produce two effects: 1. Those due to the physical absence of PAB and 2. Those of nutritional deficiency due to an incomplete medium. The second effect was obviated by adding DL-methionine (0.01%) and thymidine (0.002%) to the growth medium which lacked PAB. Thus cells were obtained which were grown in the absence of PAB but which grew as luxuriantly as did normal cells. Cells grown in such a "PAB-bypass" medium were tested for ability to synthesize malic enzyme in an experiment which paralleled the one illustrated in Fig. 1. Both the PAB-bypassed and normal cells (grown with PAB) behaved identically. Hence, it was unlikely that the action of PAB was due to mere physical presence or absence.

If, however, a PAB-deficiency caused an intracellular build-up of sub-threshold amounts of building blocks for enzyme synthesis, an increased rate of malic enzyme synthesis would result when adequate amounts of inducer were added. One could support this hypothesis if an inhibitor of protein synthesis would inhibit the synthesis of malic enzyme

by normal cells more than synthesis by PAB-deficient cells: the inhibitor would have less opportunity to inhibit a partially fabricated protein.

In the illustrated experiment, synthesis of malic enzyme by normal cells was 90% inhibited by 10 μ g. chloramphenicol (per Warburg vessel) but synthesis by PAB-deficient organisms was only 60% inhibited (Fig. 2). This decreased inhibition of malic enzyme synthesis by deficient cells supports the idea that

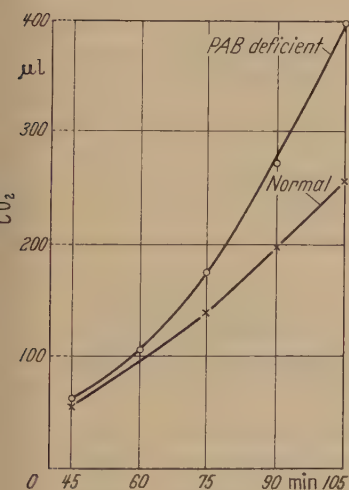


Fig. 1

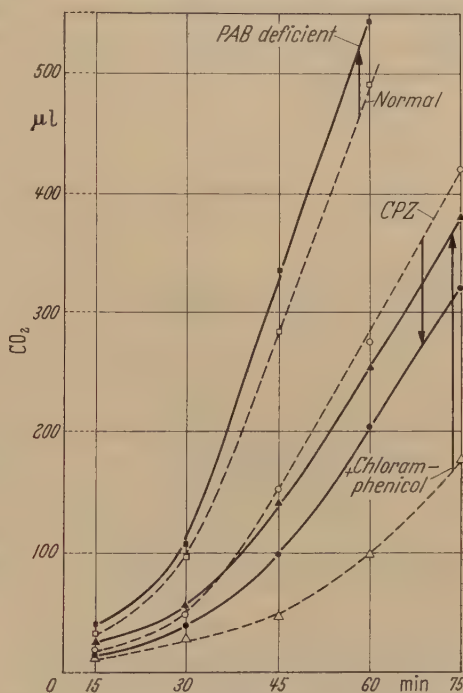


Fig. 2

Fig. 1. Effect of PAB-deficiency during growth on the ability of suspensions of *L. plantarum* to synthesize malic enzyme. Curves represent: normal cells \times — \times , PAB-deficient cells \circ — \circ

Fig. 2. Effect of chloramphenicol and CPZ on synthesis of malic enzyme. Curves represent: uninhibited, normal cells \square — \square ; uninhibited, PAB-deficient cells \blacksquare — \blacksquare ; normal + chloramphenicol (0.01 mg./Warburg vessel) \triangle — \triangle ; PAB-deficient + chloramphenicol \blacktriangle — \blacktriangle ; normal + CPZ (1. μ M./Warburg vessel) \circ — \circ ; PAB-deficient + CPZ \bullet — \bullet . Arrows point to changes which occur with deficiency

the malic enzyme was at least partially fabricated at the time of chloramphenicol addition.

Another inhibitor, chlorpromazine (CPZ), was also used to differentiate synthesis of malic enzyme by normal cells from malic enzyme synthesis by PAB-deficient cells. The effects of graded amounts of CPZ on synthesis of malic enzyme by normal and PAB-deficient organisms show that this compound is more inhibitive to enzyme synthesis by PAB-deficient cells than by normal cells (Fig. 2). Once more, cells grown in a PAB-bypass medium acted as did normal cells. Comparison of chloramphenicol and

CPZ-inhibition curves obtained during synthesis of malic enzyme, by either normal or PAB-deficient cells, show that deficiencies could be characterized not only by differences in amount of malic enzyme synthesized but also by the ratio CPZ: chloramphenicol inhibition (Fig. 2). A "normal-type" inhibition is one in which chloramphenicol ($10 \mu\text{g./Warburg vessel}$) is more inhibitive than is CPZ ($1.0 \mu\text{M./Warburg vessel}$);

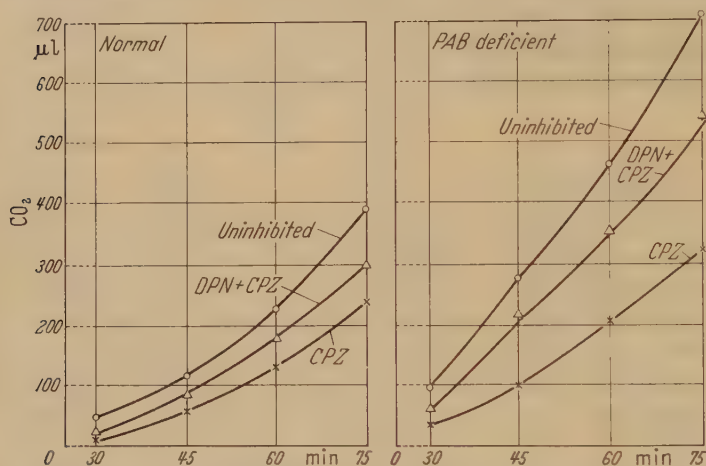


Fig. 3. Effect of CPZ on synthesis of malic enzyme by normal and PAB-deficient cells. Curves represent: no further additions \circ — \circ ; CPZ ($1. \mu\text{M./Warburg vessel}$) added at zero time \times — \times ; CPZ + DPN ($1. \mu\text{M./Warburg vessel}$) Δ — Δ

a "deficient-type" inhibition pattern is one in which CPZ is more inhibitive than chloramphenicol (Fig. 2). Cells grown with enough PAB to provide approximately half maximal growth were intermediate also with respect to inhibition by CPZ and chloramphenicol during synthesis of malic enzyme.

Even though $1. \mu\text{M. CPZ}$ inhibits 70% of malic enzyme formation by PAB-deficient cells and only 33% of malic enzyme formation by normal cells, the addition of $1. \mu\text{M. DPN}$ returns enzyme synthesis to within 25% of the uninhibited value in both cases (Fig. 3).

The effects of deficiencies of the three exogenously required nucleic acid derivatives (adenine, guanine, and uracil) were compared to the normal and PAB-deficient patterns with respect to: 1. enhancement of enzyme synthesis and 2. pattern of chloramphenicol and CPZ inhibition. All three deficiencies were accompanied by at least some enhancement of malic enzyme synthesis and showed the PAB-deficient-type inhibition pattern. The adenine-deficient cells were selected for further experiments.

When malic enzyme synthesis by adenine-deficient cells is plotted (Fig. 4), it is evident that the PAB-type pattern is followed. The

adenine-deficient cells differ from the PAB-deficient cells in that the pattern of the adenine-deficient cells may be transposed from the PAB-deficient pattern to the normal-pattern by adding adenine (0.1 mg.) at zero time of the induction period (Fig.4): both the total amount of enzyme synthesized and the degree of inhibition change towards the normal pattern.

Discussion

The experiments with single deficiencies of each of the 7 exogenously-required vitamins emphasize that any cellular function which involves a multi-component system, e.g. protein synthesis in intact cells, owes its proper function to a normally integrated or synchronized metabolism. Even a single break in this integration disorganizes this network. The enhanced, rather than reduced, synthesis of the malic enzyme by PAB-deficient cells demonstrates that one should not always expect a reduction of function when a deficiency is imposed: one should only expect change from the norm.

The reduced amount of chloramphenicol-inhibition of malic enzyme synthesis by PAB-deficient cells indicates that less new protein is synthesized from amino acids by these deficient cells *after* the addition of inducer: the additional protein is already partially synthesized at the time of addition of inducer. The difference in degree of inhibition of protein synthesis by normal and by PAB-deficient cells makes it desirable to consider *de novo* protein synthesis, at least in intact cells. While it is true that normal cells do synthesize new protein directly from amino acids, and not from already existing cell protein (SPIEGELMAN and HALVORSON 1953), this explanation may not hold for PAB-deficient *L. plantarum*. In at least this case, there seems to be utilization of a partially-fabricated "protein" or peptide formed prior to the addition of inducer. As these partially-preformed units are not functionally active malic

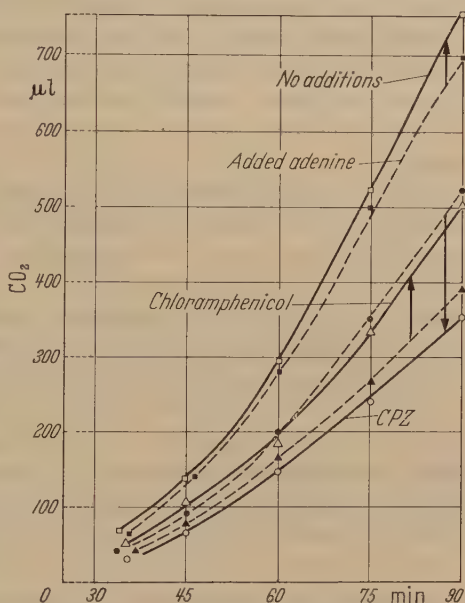


Fig.4. Effect of chloramphenicol and CPZ on synthesis of malic enzyme by adenine-deficient cells. Curves represent: no further additions \square — \square ; adenine (0.1 mg./Warburg vessel) added at zero time \blacksquare — \blacksquare ; Chloramphenicol (0.01 mg./Warburg vessel) added at zero time \triangle — \triangle ; adenine + chloramphenicol \blacktriangle — \blacktriangle ; CPZ (1. μ M./Warburg vessel) added at zero time \circ — \circ ; adenine + CPZ \bullet — \bullet .

enzyme, they do not affect estimations of the basal level of malic enzyme present before addition of exogenous inducer.

The ease with which the pattern of malic enzyme synthesis by adenine-deficient cells may be changed to one which resembles normal cells (Fig. 4), by the addition of adenine at zero time of the induction period, tempts one to suspect that, here, adenine may surpress the utilization of the partially formed fragments. Thus the fragments become unavailable for use in further protein synthesis and the cells depend upon synthesis of the new enzyme from amino acids (as is the case for normal cells).

It has been suggested (but no experimental evidence offered) that the activity of CPZ probably depends upon its ability to act as a non-specific electron donor (KARRIMAN et al. 1959). Because the decarboxylation of malate by *L. plantarum* requires DPN (KORKES and OCHOA 1948), a non-specific electron donor which reduces DPN before it could be used for this reaction could also be detected as an enzyme inhibitor. The addition of exogenous DPN should reverse this inhibition. This is indeed the case with CPZ-inhibition of malic enzyme (Fig. 3). The fact that 1. μ M. CPZ causes lesions of greater magnitude in PAB-deficient cells than in normal cells points to the possibility that the DPN-site is more accessible in the PAB-deficient cells. The possibility that there are a larger number of sensitive sites in the deficient cells than in the normal cells is unlikely because of the similar stiochiometry: 1. μ M. DPN returns enzyme synthesis, in the presence of CPZ, to 75% of the uninhibited level for both normal and deficient cells. Whether the enzyme proteins from the normal and deficient cells are different in physical characteristics awaits proof.

Summary

The reduction of synthesis of the inducible malic enzyme by cell suspensions of biotin-deficient *Lactobacillus plantarum* 17-5 is also shared by cells deficient in nicotinic acid, thiamine, and pyridoxine. Addition of the deficient vitamin at the start of enzyme synthesis increases the amount of enzyme formed.

Suspensions of riboflavin-deficient cells also synthesize a reduced amount of enzyme but addition of riboflavin does not increase enzyme synthesis. Suspensions of pantothenate-deficient cells either show a small reduction or a small stimulation of malic enzyme synthesis. Suspensions of *p*-amino benzoic acid (PAB)-deficient cells synthesize greater than normal amounts of malic enzyme.

A more detailed comparison of differences between malic enzyme synthesis by normal and by PAB-deficient cells show that chloramphenicol is more inhibitive to enzyme synthesis by normal cells and that chlor-

promazine is more inhibitive to enzyme synthesis by PAB-deficient cells. Possible explanations of the results with inhibitors are discussed.

Cells deficient in adenine, act similarly to PAB-deficient cells with respect to amount of enzyme synthesized and effect of inhibitors. The amount of enzyme synthesized and the effect of inhibitors on the adenine-deficient cells is changed to a pattern resembling that of normal cells when adenine is added at the beginning of enzyme synthesis. An interpretation of these results is offered.

Literature

- BLANCHARD, M. L., S. KORKES, A. DEL CAMPILLO and S. OCHOA: Function of biotin in the metabolism of *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.* **187**, 875 (1950).
- KARRIMAN, G., I. ISENBERG and A. SZENT-GYORGI: On the mechanism of action of chlorpromazine. *Science* **130**, 1191 (1959).
- KORKES, S., and S. OCHOA: Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.* **176**, 463 (1948).
- OCHOA, S., A. MEHLER, M. L. BLANCHARD, T. H. JUKES, C. E. HOFFMAN and M. REGAN: Biotin and carbon dioxide fixation in liver. *J. biol. Chem.* **170**, 413 (1947).
- SPIEGELMAN, S., and H. O. HALVORSON: The nature of the precursor in the induced synthesis of enzymes. In *adaptation in micro-organisms*, pp. 98—131. Edited by R. Davies and E. F. Gale. Cambridge: Cambridge University Press 1953.
- WRIGHT, L. D., and H. R. SKEGGS: Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc. Soc. exper. Biol. (N. Y.)* **56**, 95 (1944).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe

Über die Stoffausscheidung bei Pilzen. I *

Von

EWALD SPRECHER

(Eingegangen am 16. September 1960)

Die Diskussion um eine übersichtliche, den verschiedenen Gegebenheiten Rechnung tragende Einteilung der pflanzlichen Stoffausscheidungen ist auch nach der Schaffung des umfassenden Systems von FREY-WYSSLING (1935) nicht verstummt (PAECH 1950; KISSER 1958). Es erscheint daher wünschenswert, einmal die gemeinsamen Grundlagen aller pflanzlichen Stoffausscheidungen aufzuzeigen, um eine Übersicht über dieses verwickelte Problem zu gewinnen. Dazu müßten die verschiedenen Möglichkeiten auf breiter Basis an ein und demselben, relativ einfachen Zelltyp untersucht werden können. Diese Gegebenheiten werden in idealer Weise bei den landbewohnenden Pilzen realisiert. Sie besitzen nur geringe Variationsmöglichkeiten des Zelltyps und eine primitive Organisation, weisen aber bereits eine deutliche Differenzierung in ein eng mit dem Nährmedium verbundenes Substratmycel und ein aus diesem herausragendes Oberflächenmycel auf.

Ziel dieser Arbeit ist es, Ausscheidung und späteres Schicksal verschiedener Stoffwechselprodukte bei Pilzen im Laufe der Entwicklung unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen und dabei Vergleiche zu ziehen zwischen den Befunden an Substrat- und Oberflächenmycel.

Um trotz der Menge des zu verarbeitenden Materials eine gewisse Übersichtlichkeit zu bewahren, werden die primären und sekundären Stoffe (PAECH 1950) getrennt behandelt.

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst die Ergebnisse der Untersuchung über die Ausscheidung primärer Stoffwechselprodukte an zwei nahe verwandten Ascomyceten und einem physiologisch und biochemisch davon sehr verschiedenen Basidiomyceten mitgeteilt werden. Es handelt sich dabei um *Endoconidiophora virescens* Davids. (*End. vir.*) und *Endoconidiophora (Ceratocystis) coerulescens* (Münch) Bakshi (*Cer. coer.*) sowie um *Lentinus lepideus* L. (*Lent. lep.*).

I. Material und Methodik

1. Verwendete Pilze und Kulturmethoden

Sie sind bereits in früheren Arbeiten angegeben (SPRECHER 1959a, b). Änderungen dieser Methoden für spezielle Zwecke oder zusätzliche Neueinführungen werden an den betreffenden Stellen kurz beschrieben.

* Habilitationsschrift (gekürzt) der Fakultät für Natur- und Geisteswissenschaften, Technische Hochschule, Karlsruhe. Teil I.

2. Messungen der relativen Luftfeuchtigkeit

Hierzu stand ein Feuchtegehaltsmesser „Luftt“ Nr. 4 F/100 zur Verfügung. Zur Herstellung einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit in den Kulturgefäßen wurde die von WALTER (1931) angewendete Methode abgewandelt. Vor allem mußte für die oft erheblich lange Versuchsdauer eine ausreichende Luftzufuhr gesichert werden. Nach einigen Vorversuchen wurden die Versuchsreihen im wesentlichen unter folgenden Bedingungen angesetzt:

1. In vierteiligen Petrischalen (SPRECHER 1959b) wurde ein Teil mit Malzagar beschickt, beimpft und nach Bildung einer den Nährboden fast bedeckenden Myceldecke in die restlichen Teile dest. Wasser oder Salzlösungen gegeben. 2. Auf die gleiche Weise vorbereitete Petrischalen wurden in weiteren Versuchen in großen Petrischalen auf eingelegten Glasstäben über einer Lösung gehalten, die der Füllung der vierteiligen Schalen entsprach.

Tabelle 1. Zur Herstellung bestimmter relativer Luftfeuchtigkeit verwendete Salze und Wasserverlust aus dem „offenen System“ der 1. Versuchsanordnung

Verwendetes Salz	Dest. H ₂ O	K ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	KNO ₃	KCl	NaCl
Relative Luftfeuchtigkeit über der gesättigten Lösung bei 25° C	100%	99%	97%	93%	85%	76%
Durchschnittlicher Wasserverlust der Schale nach 10 Tagen	5,5 g	4,7 g	4,3 g	3,6 g	3,2 g	2,9 g
Aussehen des Nährbodens	unverändert	ganz geringe Schrumpfung	geringe Schrumpfung		zum Teil kleine Trockenrisse	Trockenrisse

In beiden Fällen wurde die Temperatur konstant auf 25° C gehalten. Um trotz des Dampfdruckunterschieds zwischen Nährboden und Salzlösung und des Wasserverlusts nach außen eine gewisse Konstanz der relativen Luftfeuchtigkeit über der Sole zu erhalten, wurden im Gegensatz zu WALTER gesättigte Salzlösungen benützt. Diese können durch Lösen oder Auskristallisieren der Salze einen Teil der zu erwartenden Konzentrationsänderungen abfangen.

Die verwendeten Salze (Tab.1) wurden nach der gewünschten relativen Luftfeuchtigkeit über der Oberfläche ihrer gesättigten Lösungen ausgewählt. Diese selbst wurde mit Hilfe einer Tabelle nach THORNTHWAITE (1956) und nach LANDOLT-BÖRNSTEIN (1953) errechnet.

In einem derartig offenen System, wie es besonders in den vierteiligen Schalen ohne weiteren Verdunstungsschutz gegeben ist, kann natürlich eine exakte Einhaltung der errechneten relativen Luftfeuchtigkeit nicht erwartet werden. Es wurden daher Kontrollversuche unter völligem Abschluß durchgeführt. Dabei wurde die große Petrischale der 2. Versuchsanordnung so verwendet, daß deren kleinere Unterseite nach oben abschloß und dabei selbst in die Sole im übergreifenden „Deckel“ eintauchte. Die Ergebnisse waren prinzipiell von den nach Versuchsanordnung 1 oder 2 gewonnenen nicht verschieden, nur der zeitliche Ablauf

war — vor allem bei der ersten Anordnung — etwas beschleunigt und gering nach den Bedingungen der niedrigeren relativen Luftfeuchtigkeit hin verschoben. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse wurden somit zwar nur teilweise unter genauer Einhaltung der angegebenen relativen Luftfeuchtigkeit gewonnen, doch erwies sich selbst die Versuchsanordnung ohne Verdunstungsschutz für eine orientierende Untersuchung als völlig hinreichend.

Um auch für diese einige quantitative Beziehungen zu ermitteln, wurde der Wasserverlust der unbeimpften Schalen nach der kritischen Versuchsdauer von 10 Tagen bestimmt. Die Durchschnittswerte aus mehreren Versuchen (Tab.1) ergaben für die Versuchsdauer, je nach Salzlösung, einen Wasserverlust zwischen 7 und 13%. Naturgemäß waren sie durch die unterschiedlich dicht schließenden Schalen teilweise beträchtlichen Schwankungen ausgesetzt (Schwankungsbreite des prozentualen Wasserverlusts bis 4%).

Der Malzagar ohne Zusatz einer Salzlösung verlor unter obigen Bedingungen durchschnittlich 3,4 g Wasser. Damit läßt sich dieses System in Tab.1 etwa zwischen KNO_3 und KCl einordnen.

Die sonst bei Versuchen dieser Art wesentliche Verdünnung der Sole durch Wasseraufnahme aus der Kultur (SCHWARTZ u. KAESS 1933) fällt unter den gewählten Bedingungen kaum ins Gewicht, da das Verhältnis des vom Agar abgegebenen Wassers zu dem Wasser in der Sole sicher kleiner als 1 : 6 ist. Dagegen wird über die Veränderungen, die der wachsende Pilz in dem angestrebten Gleichgewicht der relativen Luftfeuchtigkeit über Nährboden und Salzlösung hervorruft, noch zu sprechen sein.

Das Anwachsen der Pilze nach dem Beimpfen wurde bewußt bei höherer Luftfeuchtigkeit vorgenommen, da nicht die Keimfähigkeit oder die Entwicklungsmöglichkeiten, sondern die Guttation — nach Einstellung der gewünschten Luftfeuchtigkeit — beobachtet werden sollte.

Für die Untersuchung der zum Wachstum notwendigen Luftfeuchtigkeit wurden unter derselben Versuchsanordnung die Nährböden erst nach 12 Tagen beimpft. Nach diesem Zeitpunkt hatte sich im allgemeinen ein Gleichgewicht zwischen den Dampfspannungen an der Oberfläche des Nährbodens einerseits und über der Sole andererseits eingestellt.

3. Myceltrockengewichtsbestimmungen

Das mehrfach gewaschene Mycel wurde im Trockenschrank bei 60° C bis zu einer Gewichtskonstanz von ± 1 mg getrocknet.

4. Messung des p_H -Wertes mittels Beckmann- p_H -meter H_2

Die Nährlösungen werden auf $p_H 5,0 \pm 0,1$ eingestellt.

5. Nachweis von Exkretstoffen

Der chromatographische Nachweis der Aminosäuren, Zucker und Säuren erfolgte wie bereits angegeben (SPRECHER 1959a), die α -Ketosäuren wurden nach JONES u. a. (1953) sowie als 2,4-Dinitrophenylhydrazone nach den Methoden von CAVALLINI u. a. (1949) und EBERHARDT (1956) ermittelt.

Die semiquantitative Auswertung der Chromatogramme wurde wie früher (SPRECHER 1959a) durchgeführt. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen sind somit Relativwerte.

Die ermittelten Verbindungen wurden qualitativ und quantitativ mit den authentischen Substanzen verglichen.

6. Untersuchungen mit Hemmstoffen

Die Hemmstoffe wurden vor der Beimpfung in den folgenden Konzentrationen Normalnährlösungen (SPRECHER 1959, 1960) zugesetzt.

		Verwendete mittlere molare Konzentration	mg Hemmstoff in 100 ml Nährlösung			
Arsentrioxyd	(As ₂ O ₃)	10 ⁻⁴ M	0,2	1,0	2,0	4,0
Arsenpentoxyd	(As ₂ O ₅)	10 ⁻³ M	2,3	12,5	23,0	
2,4-Dinitrophenol	(DNP)	10 ⁻⁴ M	0,02	0,2	2,0	
Diphenylamin	(DPA)	10 ⁻⁴ M	0,45	2,25	4,5	9,0
Fluoressigsäure	(CH ₃ F · COOH)	10 ⁻³ M	0,6	6,0	30,0	60,0
Kaliumcyanid	(KCN)	10 ⁻³ M	0,65	3,25	6,5	13,0
Natriumfluorid	(NaF)	10 ⁻⁴ M	0,04	0,2	0,4	0,8

7. Farbstoffwanderung

Zur Kennzeichnung des Wasserweges an lebenden Mycelien dienten vor allem Na-Fluorescein 1 : 10000 und Berberinsulfat 1 : 1000. Bei den ausgetrockneten Mycelien und Stipuli von *Lent. lep.* wurden für beide Farbstoffe Lösungen 1 : 100 verwendet. Die Farbstoffe wurden entweder bereits vor der Beimpfung dem Nährsubstrat oder in anderen Versuchen ausgewachsenen Kulturen zugesetzt. Die Untersuchung erfolgte im UV-Licht mit Hilfe einer Lupe oder mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Reichert) an Handschnitten. Für die Farbstoffwanderung über weitere Strecken wurden vierteilige Petrischalen (SPRECHER 1959b) verwendet.

II. Ergebnisse

I. Die Ausscheidung von Stoffen, die zum primären Bau- und Betriebsmaterial gehören

A. Ausscheidung in das Substrat

Die Eigenschaft der Pilze, nicht nur durch den Verbrauch assimilierbarer Stoffe, sondern auch durch Ausscheiden von Verbindungen und Enzymen ihr Substrat zu verändern, ist schon lange bekannt und wird auch vielfach technisch benützt (PRESCOTT u. DUNN 1959). Sieht man jedoch von wirtschaftlich genutzten oder aus bestimmten Gründen wissenschaftlich interessanten Stoffen ab, fehlt es an Untersuchungen, die das Phänomen der Ausscheidungen verschiedener Stoffklassen systematisch bearbeiten und in Beziehung zum Entwicklungsalter der Pilze setzen.

Relativ wenig beachtet wurden bisher die Veränderungen der Nährlösung durch Kationenaufnahme. In neuerer Zeit konnten GLADTKE u. BRUCKER (1958) an *Phycomyces* nachweisen, daß die pH-Änderungen des Nährsubstrates nur zu einem geringen Bruchteil auf Ausscheidung von Säuren und anderen Substanzen zurückzuführen sind, und die Aufnahme der Kationen der Hauptgrund der pH-Schwankungen ist. Bei den drei untersuchten Pilzen wurden ähnliche Verhältnisse festgestellt, das

Problem jedoch quantitativ nicht weiter verfolgt, da es nicht zum eigentlichen Ziel der Arbeit gehörte.

Die Ausscheidung von Verbindungen, die Ausgangs- oder Zwischenprodukte des Zellstoffwechsels sind, wurden in ihrer vollen Bedeutung für Ökologie und Soziologie erst in neuerer Zeit wirklich erkannt. Man kann dieser Erscheinung jedoch nur dann wirklich gerecht werden, wenn man sie zunächst als Stoffwechselvorgang der einzelnen Zelle wertet.

Es ergibt sich dabei die Frage, ob Zusammenhänge bestehen zwischen den sogenannten „pools“ dieser Stoffe in der Zelle und ihrem Auftreten im Substrat, und ob es sich bei der Ausscheidung um einen aktiven oder passiven Prozeß handelt, bzw. inwieweit dieser zu beeinflussen ist. Fernerhin besteht die Möglichkeit, daß diese sogenannten primären

Tabelle 2. Veränderung von membranfiltriertem Substrat von 10 Tage alter *End. vir.*-Kultur auf Normalnährlösung mit und ohne Mycel

	1. Tag	7. Tag	23. Tag
Membranfiltriertes Substrat	Asparaginsäure 2,5 Glutaminsäure 2 Alanin 1 Asparagin 0,5 Glycin 0,5	wie am 1. Tag	wie am 1. Tag
Dasselbe Substrat mit seinem Mycel, das nach 7 Tagen abfiltriert wird	wie oben	Glutaminsäure 3,5 Asparaginsäure 2 Alanin 1 Valin 1 Glycin 1	wie am 7. Tag

Stoffe das Baumaterial für die später zu behandelnden sekundären Stoffe abgeben und ihre vergleichende Untersuchung damit allgemein zum Verständnis der Exkretion beiträgt.

Zu den Stoffgruppen, die zur Lösung dieser Frage sich anbieten, schienen die Zucker, die Aminosäuren und die niederen Carbonsäuren am meisten geeignet. Da die Aminosäuren möglicherweise nicht als solche, sondern zunächst als Peptide ausgeschieden und erst durch Ektoenzyme gespalten werden können, war es von Interesse, zunächst in dieser Richtung Untersuchungen anzustellen.

Als typisches Ergebnis soll hier die Untersuchung bei *End. vir.* angeführt werden (Tab.2). Die Verhältnisse bei den beiden anderen Pilzen sind prinzipiell die gleichen. Es zeigt sich, daß unter normalen Bedingungen Peptide in nennenswerter Menge nicht im Substrat vorliegen und das Aminosäuregemisch in den in Frage kommenden Fällen ohne Einfluß des Mycels im wesentlichen unverändert bleibt.

Die Grundlage für das Verständnis der nachfolgend geschilderten Stoffumsetzungen und -ausscheidungen bildet zunächst die Kenntnis des

„normalen“ Gehaltes der Mycelien an „freien primären Inhaltsstoffen“. Seine Veränderung im Laufe der Entwicklung und der Vergleich mit den ausgeschiedenen Verbindungen lassen bereits Rückschlüsse auf Ursache

Tabelle 3. Freie Aminosäuren, niedere Carbonsäuren und Zucker in Substrat und Mycel von *End. vir.* im Laufe der Entwicklung in Normalnährlösung

Kulturalter in Tagen	4	6	9	11	12	14	18	22	22	28	28
pH im Substrat	4,5	4,6	4,7	4,6	4,6	5,0	5,4	6,9	7,4	8,0	8,0
Mycelgewicht in mg	5	47	137	308	360	440	487	453	382	318	307
Restglucose in %	90	75	45	25	10	S.					
<i>Substrat</i>											
Asparagin	6	5	3	2	1,5	0,5					
Asparaginsäure	1	1,5	1,5	1	1	0,7	g.S.				
Glutaminsäure	0,5	S.	0,7	0,5	1,5	0,5	S.	g.S.	g.S.	1,5	1,5
Alanin		g.S.	1	0,5	S.	0,5	S.	g.S.	g.S.	S.	S.
Glycin										S.	0,5
Valin										S.	S.
Threonin										S.	S.
Brenztraubensäure	2	3	3,5	4	4	3	2,5	1	0,5	1	2
Acetessigsäure	1	1,5	2,5	2	0,7	0,5	1	1	1,5	0,5	1
α -Ketoglutarsäure	1	1	0,7	0,7	0,7	0,5	0,7	1	1,5	1,5	2
Oxalessigsäure			S.	S.	g.S.	S.	S.	g.S.	g.S.	g.S.	g.S.
<i>Mycel</i>											
Glucose	S.	S.	0,5	1	0,5	1	0,5	S.	S.	S.	
Fructose		g.S.	S.	S.	S.	S.	S.				
Sedoheptulose		S.	S.	S.	0,5	g.S.					
Alanin	4	3	4	5	4	4	4	2	2	1	0,7
Glutaminsäure	2	1	1,5	3	3	4	1,5	1	1	1,5	0,7
Asparagin	1,5	0,5	S.	0,5	S.						
Glycin	1		1,5	2	0,5	1,5		g.S.	g.S.	S.	0,7
Valin	g.S.	0,7	3	4	4	5	1,5	0,7	0,7	S.	S.
Asparaginsäure	g.S.			1	0,7	1	0,5	g.S.	g.S.	S.	g.S.
Threonin		S.		2	2	2	1	S.	S.	S.	0,5
γ -Aminobutter- säure		S.		1	0,7						
α -Ketoglutarsäure					S.		1,5	1,5	1	0,5	2
Brenztraubensäure					S.		1	1	1	S.	2
Acetessigsäure								g.S.	g.S.		1
Bernsteinsäure			0,5	0,5	0,5	S.	S.	S.			
Citronensäure			S.		0,5	S.	S.	S.	S.		
Apfelsäure			S.		0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	

Erklärung der Mengenangaben: 6 = größte Menge; S. = Spur; g. S. = geringe Spur.

und primäre Bedeutung der Ausscheidung zu (Tab. 3—5). Die Tab. 3 und 4, die aus den Ergebnissen mehrerer Versuchsserien zusammengestellt sind, zeigen, daß die untersuchten Stoffe bei *Cer. coer.* und *End. vir.* sich grundsätzlich ähnlich verhalten. Folgende Befunde lassen sich als wesentlich herausstellen:

Glucose und Asparagin werden laufend verbraucht und verschwinden schließlich völlig aus dem Nährmedium. Dagegen treten mit Beginn des Wachstums bestimmte Aminosäuren und α -Ketosäuren im Substrat auf.

Tabelle 4. *Freie Aminosäuren, niedere Carbonsäuren und Zucker in Substrat und Mycel von Cer. coer. im Laufe der Entwicklung in Normalnährlösung*

Kulturalter in Tagen	4	6	7	10	11	14	18	21	21	28	28
pH im Substrat	4,9	6,3	6,5	6,5	6,2	5,7	6,3	7,2	8,0	8,0	7,8
Mycelgewicht in mg	5	51	140	217	247	303	288	274	235	216	160
Restglucose in %	90	70	40	36	25	10	g.S.				
<i>Substrat</i>											
Asparagin	6	5	2	0,7	S.	g.S.					
Asparaginsäure	1	0,7	0,5		S.	g.S.	g.S.			0,5	S.
Glutaminsäure	g.S.	0,5	0,5		S.	S.	0,5	g.S.		1	S.
Alanin		0,7	2	0,7	g.S.	0,5	g.S.	g.S.		S.	S.
Valin										0,7	1
Glycin										0,7	S.
Threonin										0,5	0,5
Brenztraubensäure	3	3	3	3,5	3,5	3,5	4,5	4	3,5	3,5	3
α -Ketoglutarsäure	2	2	2,5	2,5	2,5	2,5	4	3,5	3	2,5	3
Acetessigsäure	2	2	2,5	2	2,5	2	3	3	2	1,5	2
Oxalessigsäure			1	1	1	1	1	S.	S.	S.	S.
p-Hydroxyphenyl- brenztraubensäure				S.		S.	0,5	1	0,5	0,5	0,5
<i>Mycel</i>											
Glucose	0,5	1,5	2	2	0,7	1,5	S.	g.S.	S.		
Fructose		g.S.	S.	g.S.	g.S.	g.S.	g.S.	g.S.	g.S.		
Sedoheptulose	g.S.			0,5	g.S.	0,5					
Alanin	3,5	3	4	5	5	4	3	2	1	1	0,5
Glutaminsäure	1,5	1	2	2	2,5	4	1,5	0,7	1	1	0,7
Asparagin	1,5	1	1,5	1	0,5						
Glycin	1	1	0,5	2	2	1,5	0,7	S.	g.S.	S.	0,5
Valin	g.S.	0,7	1,5	5,0	4,5	5	1,5	1,5	0,5	S.	S.
Asparaginsäure	g.S.	0,7	1	0,5	1	1	0,5	g.S.	S.	g.S.	S.
Threonin		0,7	1	1	2	2	1	0,5	S.	S.	
γ -Aminobutter- säure		0,5					0,7	0,7			
Leucin		0,5			2						S.
Brenztraubensäure	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	2	0,5	1
α -Ketoglutarsäure		S.	S.	S.	S.	S.	0,5	S.	1	0,5	1
Acetessigsäure									S.		
Oxalessigsäure											S.

Mengenangaben in Tab. 4 und allen weiteren Tabellen wie in Tab. 3.

Während aber die Aminosäuren etwa mit der Erschöpfung der C- und N-haltigen Nährstoffe durch ein Minimum gehen, trifft dies bei der Menge der α -Ketosäuren nicht zu. Sieht man von dem zugesetzten Asparagin

und von dem letzten Stadium der Autolyse ab, so ist die Hauptmenge der Aminosäuren immer im Mycel enthalten, die α -Ketosäuren sammeln sich bei beiden Pilzen dagegen im wesentlichen im Substrat an.

Im einzelnen dürfte die Asparaginsäure im Substrat zum größten Teil aus ihrem Amid entstanden sein. Die Glutaminsäure und das Alanin stellen jedoch mit Sicherheit Ausscheidungsprodukte dar, selbst wenn sie erst durch Transaminierung der ausgeschiedenen α -Ketosäuren im Substrat entstanden sind. Auffallend ist, daß außer diesen beiden Aminosäuren bzw. ihren entsprechenden α -Ketosäuren während der Periode des Mycelwachstums keine andere Aminosäure ausgeschieden wird, auch nicht das im Mycel teilweise am meisten vorhandene Valin. Erst mit einsetzender Autolyse treten noch weitere Aminosäuren im Substrat auf, während die im Mycel befindlichen stark abnehmen, wenn die N-Zufuhr von außen aufhört.

Die Befunde beweisen, daß die erwähnten Verbindungen im Substrat nicht von einer Autolyse älterer Zellen herrühren, da sonst noch Spuren anderer Aminosäuren während der Wachstumsperiode hätten nachgewiesen werden müssen. Mindestens die α -Ketosäuren sind echte Ausscheidungsprodukte, wobei die Permeabilität des Plasmas gegenüber verschiedenen Verbindungen sich offensichtlich völlig unterschiedlich verhält. So wird von dem angebotenen Asparagin nur sehr wenig im Mycel gespeichert, während es vor allem bei Alanin und später auch bei Valin in den Hyphen beider Pilze zu einem förmlichen Anstau kommt. Dagegen scheint bei den α -Ketosäuren, von geringen Mengen abgesehen, von Anfang an nur die Alternative Verbrauch oder Ausscheidung zu bestehen. Ihre mögliche Synthese in einer äußeren Stoffwechselregion soll in der Diskussion erörtert werden.

Für eine Analyse des Stoffwechsels lassen sich bemerkenswerte Beziehungen von Alanin und Glutaminsäure zu den ihnen entsprechenden α -Ketosäuren feststellen. Demgegenüber wird die Oxalessigsäure, die durch den Verbrauch des Asparagins reichlich zur Verfügung stehen müßte, anscheinend laufend weiterverbraucht. Der Nachweis der meisten Säuren des Krebscyclus macht wahrscheinlich, daß sie in diesen Kreislauf eingehen.

Im Gegensatz zu den beiden Ascomyceten läßt sich der Entwicklungsablauf bei *Lent. lep.* zeitlich nicht exakt reproduzieren (SPRECHER 1960). Die Einordnung in die folgenden Tabellen erfolgt daher bei diesem Pilz nach gewissen Wachstumskriterien (SPRECHER 1960). Ferner scheidet *Lent. lep.* (Tab.5) viel weniger α -Ketosäuren in das Substrat ab, während sie im Mycel stärker auftreten. Das relativ frühe Erscheinen von Valin im Substrat läßt im Vergleich zu *End. vir.* und *Cer. coer.* die Möglichkeit offen, daß bei diesem langsam wachsenden Basidiomyceten in älteren Hyphen bereits eine Teilautolyse eintreten kann, während das Mycel erst

knapp über die Hälfte seines Endgewichtes erreicht hat. Auffällig ist auch, daß im Gegensatz zu *End. vir.* aber ähnlich wie bei *Cer. coer.*, die gebildeten Säuren mit dem pH -Minimum in Beziehung stehen, wenn sie

Tabelle 5a. Freie Aminosäuren, niedere Carbonsäuren und Zucker in Mycel und Substrat von *Lent. lep.* im Laufe der Entwicklung in Normalnährlösung

Kulturalter: 40—98 Tage

	Dunkelkulturen									
pH im Substrat	4,7	4,4	4,3	4,2	4,0	3,9	4,1	3,8	3,5	
Mycelgewicht in mg	25	64	93	153	188	243	320	309	303	
Restglucose in Prozent	90	80	60	35	30	20	5			
<i>Substrat</i>										
Asparagin	6	4,5	4	3,5	2,5	1,5	1			
Asparaginsäure	1	1	1	1	0,7	0,7	1	g.S.	g.S.	
Glutaminsäure	0,7	0,7	0,7	0,7	1	1	1	0,5	g.S.	
Alanin	g.S.	0,7	0,7	0,7	2	2	1,5	0,5	g.S.	
Glycin							0,5			
Valin					S.	S.	g.S.			
Brenztraubensäure	0,7	0,5	1	1	1	1	0,7	g.S.	1,5	
α -Ketoglutarsäure	1				0,5	0,5	0,7		0,5	
Oxalessigsäure	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,7		0,7	
Acetessigsäure	g.S.	S.	0,7	0,7	0,5	0,5		g.S.	0,5	
Bernsteinsäure					S.	S.	S.	1		
<i>Mycel</i>										
Glucose	S.	1	0,7	1,5	1	1	1,5	1,5	S.	
Fructose		S.	0,5	0,5	g.S.	g.S.	S.			
Sedoheptulosephosphat		g.S.	0,5	S.			g.S.	S.		
Sedoheptulose		S.	g.S.	g.S.	g.S.	S.	0,5			
Alanin	0,7	1,5	2,5	2,5	2	2	2	2,5	g.S.	
Glutaminsäure	0,5	0,5	1	1	1	1,5	1,5	1,5	g.S.	
Asparagin	S.	0,7	1,5	1						
Valin	g.S.	1	2	2	2	2	2	2,5		
Asparaginsäure	g.S.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,5		
Threonin	g.S.				0,5	0,5	1	0,5		
Leucin		S.			0,5	0,5	0,5	0,5		
Glycin		0,5	1	1	1	1,5		S.		
Brenztraubensäure	1	S.	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	
α -Ketoglutarsäure	S.	0,5	S.	S.	1	1	S.	S.	S.	
Oxalessigsäure									0,7	
Acetessigsäure									S.	
Bernsteinsäure					S.	S.	0,5	0,5		
Apfelsäure					S.	S.	0,5	0,5		
Zitronensäure							0,5			

sicher auch nicht ausschließlich dafür verantwortlich sind. Das Verschwinden der Glucose und des Asparagins aus der Nährlösung, das Versiegen der Aminosäureausscheidung nach Aufbrauchen des Asparagins und ein gewisser Zusammenhang zwischen α -Ketosäureproduktion und

Stoffwechselaktivität entsprechen etwa den Befunden bei den beiden Ascomyceten.

Das Auftreten von freien Säuren erweist sich bei allen drei Pilzen, besonders aber bei *Lent. lep.*, als Indicator für die Stoffumsetzungen. Während die α -Ketosauren in der Periode des Wachstums die Stoffwechselintensität anzeigen, lassen sie sich mit einsetzender Autolyse wieder verstärkt im Substrat nachweisen. Sie sind dann neben den

Tabelle 5b. *Freie Aminosäuren, niedere Carbonsäuren und Zucker in Substrat und Mycel von Lent. lep. im Laufe der Entwicklung in Normalnährlösung.*

Kulturdauer: 41—79 Tage

	Hellkulturen									
pH im Substrat	4,7	4,1	4,2	4,0	3,7	3,6	5,0	5,1	5,4	6,1
Mycelgewicht in mg	25	51	57	74	233	316	347	286	287	211
Restglucose in Prozent	85	80	75	70	35	15				
<i>Substrat</i>										
Asparagin	5	4	4	4	3	3	2	2	2	2,5
Asparaginsäure	1	1	1	1	0,7	0,7	S.	0,7	1,5	1
Glutaminsäure	0,7	1	0,7	0,7	2	2	1,5	2	2,5	
Alanin	g.S.	0,5	0,5	S.	2,5	3	1	4	2,5	2,5
Glycin									S.	S.
Valin								0,5	2,5	3
Brenztraubensäure	0,7	1,5	4	0,7	0,5	2	1,5	3	1,5	3
α -Ketoglutarsäure	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1,5
Oxalessigsäure	0,5	1	1	1	0,5	1	1	1	1	0,7
Acetessigsäure	g.S.	0,5	g.S.	g.S.	S.	0,5	1,5	2	0,5	2
<i>Mycel</i>										
Glucose	S.		0,5	0,7	g.S.	g.S.	g.S.	0,5		
Alanin	0,7	1,5	2	2	4	4	2,5	3	2,5	0,5
Glutaminsäure	0,5	1	1	1,5	2	3	2,5	1,5	1,5	0,7
Asparagin	S.	0,5	1	1	2	2,5	1,5	0,7	1,5	0,5
Valin	g.S.	0,5	g.S.	0,5	2,5	3	1	3,5	1	0,5
Asparaginsäure	g.S.	g.S.	g.S.	S.	0,5	1	0,5	0,5	0,7	S.
Brenztraubensäure	g.S.	g.S.	1	g.S.	1,5	3	g.S.	1,5	0,5	0,5
α -Ketoglutarsäure	g.S.	0,7	S.	g.S.	1	1	0,5	0,5	1	S.
Acetessigsäure	g.S.		g.S.	g.S.	S.	0,5	g.S.		S.	S.

übrigen niederen Carbonsäuren, denen PAECH (1950) eine Zwischenstellung zwischen primären und sekundären Stoffen einräumt, vor allem bei *Cer. coer.* und *Lent. lep.* Ausdruck von Stoffwechselstörungen. Diese treten besonders auf, wenn die C-Quelle nahezu verbraucht ist und der Citronensäurecyclus nicht mehr geregelt abläuft. Die dadurch anfallenden Säuren werden später wieder verbraucht.

Grundsätzlich muß zu den oben geschilderten Stoffumsetzungen noch gesagt werden, daß Schwankungen in der Temperatur und bei *Lent. lep.* in den Beleuchtungsverhältnissen nicht nur zu zeitlichen Verschiebungen,

sondern auch zu gewissen qualitativen Unterschieden des Stoffwechselablaufes führen können. Während solche bei den zwei rasch wachsenden Ascomyceten relativ gering sind, können sie bei *Lent. lep.* zu einer verschiedenen Ausnutzung des Asparagins führen, das zu einem Zeitpunkt unter Umständen erst zu 60% verbraucht ist, wenn bereits keine Glucose mehr zur Verfügung steht. Hierdurch wird das Substrat nicht so sauer und die Produktion sekundärer Stoffe zur Farbstoffbildung hin verschoben. Der Umsatz der Amino- und α -Ketosäuren wird davon vergleichsweise weniger stark berührt, doch ist unter diesen Bedingungen das Substrat nicht wie sonst nach Verbrauch der Glucose und der N-Quelle nahezu frei von Aminosäuren. (Tab. 5b).

Es ist interessant, daß gleichlaufend mit diesen von Temperatur und Licht beeinflussten Stoffwechselverschiebungen bei *Lent. lep.* auch morphologische Veränderungen eintreten können. Besonders auffallend ist in dieser Hinsicht die Bildung von Stipuli (sterile Fruchtkörperansätze), die durch Licht und höhere Temperatur gehemmt, durch Temperaturen um 20° C und Dunkelheit jedoch gefördert wird.

Diese Befunde leiten über zu Stoffwechsel-Untersuchungen mit dem Ziel, durch Variation des Substrates die Stoffausscheidung zu beeinflussen. Folgende Substratvariationen wurden dabei vorgenommen: 1. Veränderungen im C:N-Verhältnis; 2. Ersatz von Glucose durch andere C-Quellen; 3. Ersatz von Asparagin durch andere N-Quellen; 4. Änderung der Sauerstoffspannung in der Kultur; 5. Zusatz von Stoffwechselinhibitoren; 6. Einwirkung von Faktoren, die die Permeabilität beeinflussen.

1. Durch Veränderung des C:N-Verhältnisses (von 5:1 bis 160:1) wurden der Stoffwechsel und die Stoffausscheidung im Hinblick auf die untersuchten „freien, primären“ Produkte im wesentlichen nur in quantitativem Sinne beeinflusst. Tab. 6 zeigt ein für alle drei Pilze typisches Versuchsergebnis bei *End. vir.*

Auf den ersten Blick scheint die Ausscheidung der Aminosäuren in das Substrat durch das C:N-Verhältnis stark beeinflusst zu sein. Wird derselbe Versuchsansatz jedoch zu einem früheren Zeitpunkt analysiert, in welchem das Asparagin in dem Ansatz mit der geringsten Menge gerade erst verbraucht ist und in allen Kulturen noch etwa 20–30% der zugegebenen Glucose im Substrat vorliegen, so ergibt sich die interessante Tatsache, daß darin bei einem pH zwischen 4,0 und 4,2 bei jedem untersuchten C:N-Verhältnis gleiche Mengen Alanin und Glutaminsäure enthalten sind. An Aminosäuren ist außerdem nur noch das verabreichte Asparagin bzw. die direkt daraus ableitbare Asparaginsäure vorhanden.

Die demgegenüber deutlichsten Unterschiede bei den Ergebnissen der Tab. 6 lassen sich im wesentlichen auf den verschiedenen Entwicklungs-

zustand des Pilzes zurückführen. So haben die Aminosäuren des Substrates in der 1. Spalte der Tabelle (Asparagin-Konzentration 0,05%) jenen mengenmäßigen Tiefstand erreicht, der auch in den Tab. 3—5 zum Ausdruck kommt, während in Spalte 2 bereits die ersten Anzeichen einer Autolyse erkennbar sind, die in den Versuchsreihen der Spalten 3 und 4 gerade einsetzt.

Tabelle 6. *End. vir. auf Normalnährlösung mit 1% Glucose und verschiedenen Mengen Asparagin nach achttägiger Kultur*

Asparagin im Ausgangs- substrat in Prozent	0,05	0,18	0,48	0,72
Myceltrockengewicht in Milligramm	230	257	285	290
p _H im Substrat	4,2	6,5	8,3	8,0
<i>Substrat</i>				
Restglucose in Prozent	5	5	g.S.	S.
Asparagin	—	—	0,7	2
Asparaginsäure	—	0,5	1	1,5
Alanin	—	0,5	0,7	1,5
Glutaminsäure	—	—	1,5	1,5
Brenztraubensäure	1	1	0,7	0,7
α -Ketoglutarsäure	0,5	1	0,7	0,7
Oxalessigsäure	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Mycel</i>				
Glucose	S.	0,5	0,5	0,5
Alanin	1,5	3	3	3
Valin	1,5	1,5	1,5	1,5
Glutaminsäure	1	2	2,5	2,5
Leucin	0,5	0,5	0,5	0,5
Threonin	0,5	0,7	0,7	1
Asparaginsäure	S.	1	1	2
Asparagin	S.	0,7	0,7	1
Citronensäure	0,5	0,5	1	1
Apfelsäure	—	—	1	1
Bernsteinsäure	—	—	0,5	0,5
α -Ketoglutarsäure	—	—	0,5	0,5

Allgemein läßt sich sagen, daß Variierung des C : N-Verhältnisses die Aminosäure-Ausscheidung in das Substrat im wesentlichen nur quantitativ beeinflußt. Am stärksten kommt dies bei *Lent. lep.* zum Ausdruck, wo innerhalb gewisser Grenzen von der Menge des angebotenen Stickstoffs auch die Quantität der ausgeschiedenen Aminosäuren abhängt.

Die freien Aminosäuren im Mycel verdeutlichen, daß erst bei sehr großen Unterschieden im N-Angebot gewisse quantitative Verschiebungen des Stoffwechsels eintreten.

Nach Verbrauch der geringen Asparaginmenge (Spalte 1) wird bezeichnenderweise nur die Menge der Grundaminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure reduziert, ohne daß es zu einem Mehranfall der entsprechenden α -Ketosäuren kommt. Der Befund unterstützt die Hypothese von COWIE (1959), nach der diese Verbindungen im „internal pool“ teilweise zu anderen Aminosäuren transformiert und dann in die Proteine eingebaut werden. Auf sie soll in der Diskussion noch näher eingegangen werden.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß die untersuchten Pilze mit relativ geringen N-Mengen auskommen können, wofür auch Translokationsversuche sprechen. Da Holz befallende Pilze unter natürlichen Bedingungen mit dem niederen Stickstoffgehalt des Holzes (CARTWRIGHT u. FINDLAY 1946) auskommen müssen, überrascht der Befund nicht.

2. Ersetzt man Glucose im Nährmedium durch Glycerin, Äthanol oder Krebscyclus-Zwischenprodukte, so werden diese Stoffe verschieden gut verwertet. Während auf Äthanol, Bernsteinsäure und Apfelsäure in vergleichbaren Konzentrationen das Wachstum von *Cer. coer.* und *End. vir.* etwa demjenigen auf Glucose entspricht, ergeben Glycerin und Citronensäure nur ein geringes Mycelgewicht. *Lent. lep.* wächst auf Glucose und Glycerin am besten, alle anderen untersuchten C-Quellen werden bedeutend schlechter verwertet.

Bei *End. vir.* tritt nach Verabreichung von Bernstein- oder Apfelsäure als einziger C-Quelle wesentlich mehr α -Ketoglutar säure als Brenztraubensäure im Substrat auf, während bei Glucose, Glycerin oder Äthanol als C-Quelle die Verhältnisse genau umgekehrt liegen. In *End. vir.*- und *Cer. coer.*-Kulturen konnten darüber hinaus bei Bernsteinsäure als C-Quelle neben dieser selbst mehr als üblich Apfelsäure und α -Ketoglutar säure in Substrat und Mycel nachgewiesen werden. Unter der Annahme eines funktionierenden Krebscyclus sind diese Befunde durchaus verständlich. Sie können sogar als weitere Stütze für diese Vermutung gelten, zumal auch die manometrischen Messungen durchaus in die gleiche Richtung weisen. Die schlechte Verwertung einiger Zwischenprodukte des Citronensäurecyclus läßt sich durch Permeabilitätsschwierigkeiten erklären.

Damit werden auch die unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur geringfügigen Verschiebungen des Stoffwechsels begreiflich, wird doch in jedem Falle das gleiche Abbauschema durchlaufen. Dies kommt auch darin zum Ausdruck, daß in einem bestimmten Wachstumsstadium bei jeder der verwendeten C-Quellen im Mycel stets Glucose nachzuweisen ist, der Pilz diesen Zucker also aus den anderen Verbindungen synthetisieren kann.

Darüber hinaus konnte in vielen Fällen Fructose, Sedoheptulose und Sedoheptulosephosphat im Mycel nachgewiesen werden. Da EBERHARDT

(1956) im Kulturfiltrat von *Lent. lep.* dazu noch Ribose fand, liegt der Schluß nahe, daß mindestens in diesem Pilz auch der Pentosecyclus (RACKER 1954) abläuft.

Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mittlerer Kettenlänge wurden von allen drei Pilzen ohne Zusatz von Glucose nur sehr schlecht verwertet. Bei Zufügung von 1 % Glucose wuchsen vor allem *Cer. coer.* und *End. vir.* durchaus zufriedenstellend, wenn sie auch schon bald das Aussehen alter Kulturen annahmen. Die freien primären Produkte unterschieden sich kaum von denen normaler Glucose/Asparagin-Kulturen. Bemerkenswert war lediglich ein Citronensäure-Anfall bei *Cer. coer.* auf Fettsäuren ohne Glucose, während bei *End. vir.* unter denselben Umständen diese Säure nicht auftrat.

3. Bei Ersatz des Asparagins durch NH_4NO_3 änderte sich am Stoffwechsel und an der Stoffausscheidung der „primären“ Produkte bei allen drei Pilzen im grundsätzlichen nichts, auch dann nicht, wenn gleichzeitig das C:N-Verhältnis variiert wurde. Lediglich der schon früher erwähnte Effekt der Kationenaufnahme aus dem Substrat macht sich bei *Cer. coer.* und *End. vir.* stark bemerkbar. Während die Säure-Ausscheidung den pH -Wert der Nährlösung kaum beeinflußt, wird dieser durch den Verbrauch des Ammonium-Ions sehr stark nach der sauren Seite hin verschoben. Bei *End. vir.* tritt unter diesen Umständen im Bereiche eines C:N-Verhältnisses von 16 : 1 bis 8 : 1 nach Erschöpfung der Glucose eine „saure“ Autolyse bei pH 2,2 ein. Geringere NH_4NO_3 -Mengen im Substrat (0,05%) lassen den pH -Wert nicht so stark absinken, die Autolyse beginnt in diesem Falle etwa bei einem pH von 4,1. Auch mit höheren Ammoniumnitrat-Konzentrationen (1,4%) wird das Substrat nicht so sauer wie mit mittleren.

In Normalkulturen von *Lent. lep.* liegen die pH -Werte im Verlaufe des Wachstums immer tiefer als in denen der beiden Ascomyceten. Ersetzt man jedoch das Asparagin durch Ammoniumnitrat, so reagiert der Pilz völlig anders als *Cer. coer.* und *End. vir.* Der pH -Wert sinkt in diesem Falle nicht unter den der Asparaginkulturen. Der Grund für dieses Verhalten liegt darin, daß *Lent. lep.* auch den Nitrat-Stickstoff verwerten kann. Dafür spricht auch die Tatsache, daß das Mycelgewicht von *Lent. lep.* bei Ammoniumnitrat-Kulturen etwa dem von Asparaginkulturen entspricht, während *End. vir.* und *Cer. coer.* die anorganische N-Quelle viel schlechter verwerten.

4. Ersetzt man das Asparagin in der Nährlösung durch solche Aminosäuren, die auch frei in Substrat und Mycel der betreffenden Pilze vorkommen, so sind in Umsatz und Ausscheidung der primären Stoffe interessante Änderungen zu beobachten. Durch das Überangebot der betreffenden Aminosäuren ergeben sich in Substrat und Mycel

Veränderungen (Tab.7), die bezüglich der Aminosäuren durch drei Stoffwechselreaktionen erklärbar sind:

1. Hemmung der Synthese einiger Aminosäuren durch deren Zufuhr von außen (Glutaminsäure). 2. Anstau und nachfolgende Aminierung

Tabelle 7. *Freie Aminosäuren, niedere Carbonsäuren und Zucker in Substrat und Mycel von End. vir. auf Normalnährlösung mit verschiedenen N-Quellen*

N-Quelle	NH ₄ NO ₃	Aspara- ginsäure	Glut- amin- säure	Glycin	Alanin	Valin	Leucin
pH im Substrat	2,4	8,5	7,1	7,0	7,0	3,6	4,1
Myceltrockengewicht in Milligramm	609	710	669	638	650	634	203
Restglucose im Substrat in Prozent	S.	—	15	10	10	10	30
<i>Substrat</i>							
Asparaginsäure	2	0,5	—	—	—	—	—
Glutaminsäure	1	3	0,5	1	—	S.	S.
Alanin	0,5	0,5	1	2,5	1	0,5	0,5
Glycin	—	—	2,5	—	—	—	—
Valin	—	—	S.	—	4	—	—
Leucin	—	—	—	—	—	4	—
Oxalessigsäure	2	1,5	S.	g.S.	S.	1	1,5
BTS	1	2	3	3	1,5	1,5	2
α-Ketoglutarsäure	1	2,5	2	2	1	—	2,5
p-Ph-BTS	—	—	S.	—	S.	1,5	—
<i>Mycel</i>							
Glucose	g.S.	1	g.S.	g.S.	S.	0,5	0,5
Fructose	g.S.	S.	g.S.	g.S.	g.S.	g.S.	S.
Sedoheptulosephosphat	überall geringe Spur						
Sedoheptulose	—	—	S.	S.	—	—	—
Alanin	2,5	2,5	3	3,5	2,5	2,5	2,5
Glutaminsäure	2,5	2,5	1	1	2	1	2
Asparaginsäure	1,5	1,5	1	1	0,5	0,5	1
Valin	1	1	1	1	3	2	1,5
Leucin	1	1	0,7	0,5	1	3	1
Threonin	0,5	0,5	—	—	1	1	—
Glycin	0,5	0,5	3,5	2,5	0,5	0,5	S.
Citronensäure	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Apfelsäure	1	0,5	—	—	0,5	—	—
BTS	—	—	—	—	0,5	—	—

BTS = Brenztraubensäure; p-Ph-BTS = p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure.

bestimmter α-Ketosäuren durch übermäßige Belieferung des Krebs-cyclus mit dem C-Gerüst einiger der zugeführten Aminosäuren (besonders Glutaminsäure und Glycin), sowie dadurch hervorgerufene Verringerung der Menge anderer Amino- und α-Ketosäuren. 3. Verschiebungen im Biosynthese-Gleichgewicht zwischen einigen Amino-

säuren durch Zufuhr des verwandten C-Gerüsts einer anderen Aminosäure (besonders Leucin und Valin).

Diese Befunde lassen sich auch auf die α -Ketosäuren ausdehnen, womit die enge Verbindung zwischen den beiden Stoffklassen deutlich wird.

Sehr aufschlußreich, besonders für den sekundären Stoffwechsel, ist der Einfluß der verabreichten Aminosäuren auf die Verwertbarkeit des Zuckers für Wachstum und Vermehrung, soweit diese im Mycelgewicht zum Ausdruck kommen. Darauf wird später noch eingehend Bezug genommen, doch soll hier bereits vermerkt werden, daß Leucin, ähnlich wie Nitrat, bei *Lent. lep.* eine hohe Mycelausbeute bewirkt, bei *End. vir.* und *Cer. coer.* dagegen neben Valin die schlechteste. Mit Asparaginsäure liegt der Fall genau umgekehrt. Möglicherweise spielt bei der schlechten Verwertbarkeit von Leucin und Valin auch der durch beide Aminosäuren hervorgerufene niedere p_H -Wert im Substrat eine Rolle, er entspricht etwa dem auf Ammoniumnitrat als N-Quelle.

5. Eine Änderung der Sauerstoffspannung in den verwendeten Kulturen wurde einerseits durch N_2 -Atmosphäre, andererseits durch Schüttelkulturen und in beschränktem Maße durch Belüftung erreicht. Die Untersuchungen in N_2 -Atmosphäre, die besonders an den beiden Ascomyceten durchgeführt wurden, ergaben bei sehr niedriger O_2 -Spannung noch ein, allerdings stark verlangsamtes, Wachstum. Die Adaptationsperiode dauert in diesem Fall etwa zehnmal so lange wie unter normalen Bedingungen.

Aus dem Vergleich von Mycelgewicht und p_H des Substrates zwischen N_2 -Kulturen und Kontrollen geht hervor (SPRECHER 1960), daß der Stoffwechsel anaerob nicht genau in derselben Weise wie unter aeroben Bedingungen verläuft. Trotzdem lassen sich keine tiefgreifenden Unterschiede in den freien primären Stoffen in Substrat und Mycel feststellen. Bei völligem O_2 -Ausschluß fällt lediglich auf, daß von derselben Menge Glucose weniger Mycel aufgebaut und entsprechend weniger Asparagin verbraucht wird im Vergleich zu aeroben Kulturen.

Verstärkte Sauerstoffzufuhr durch Belüftung führte, insbesondere bei *Lent. lep.*, zu beschleunigtem Wachstum, während in Schüttelkulturen bei keinem der drei Pilze dasselbe Ergebnis erzielt wurde. Dies ist wohl auf die dabei erzwungene Submersentwicklung zurückzuführen. Beide Ascomyceten erreichten jedoch auch unter diesen Bedingungen ihr normales Mycelgewicht, *Lent. lep.* dagegen nicht.

Im Gegensatz zu den deutlichen Unterschieden der *Lent. lep.*-Schüttelkulturen gegenüber Normalkulturen mit Oberflächenmycel hinsichtlich der sekundären Ausscheidungen ist bei den primären Stoffen kaum eine Veränderung festzustellen. Dies gilt auch weitgehend für die zwei anderen Pilze. Bei Betrachtung der Mengenverhältnisse der α -Ketosäuren

im Substrat fällt allerdings auf, daß in den Schüttelkulturen von *Cer. coer.* und *End. vir.* wesentlich weniger Acetessigsäure und α -Ketoglutarsäure vorhanden sind als in den Standkulturen (Tab.8). Bei noch wachsenden Kulturen mit nicht völlig verbrauchtem Zucker kann der

Tabelle 8. Vergleich der freien primären Stoffwechselprodukte von *Cer. coer.*-Schüttelkulturen mit einer Standkultur

	Schüttelkulturen				Standkultur	
pH im Substrat	4,7	4,7	5,0	4,7	8,2	5,8
Farbe des Substrats	farblos	S. gelbl.	gelblich	gelb	gelb	S. gelbl.
Myceltrockengewicht in mg	12	71	172	393	235	410
Restglucose im Substrat in Prozent	80	65	45	5		10
<i>Substrat</i>						
Asparagin	5	4	4	S.		0,7
Glutaminsäure	1	1	1	S.	1	S.
Alanin		0,5	0,5	0,5	1	0,5
Asparaginsäure	0,5	g.S.	g.S.	g.S.	g.S.	S.
Valin					0,5	
Leucin					0,5	
Threonin					0,5	
Brenztraubensäure	2	5	7	6	1	7
Acetessigsäure	1,5	2	2	1	g.S.	6
α -Ketoglutarsäure	1	2	1,5	1	1	3
Oxalessigsäure	g.S.	S.	1	g.S.	g.S.	1
<i>Mycel</i>						
Glucose	0,7	0,7	0,5	2	S.	3,5
Sedoheptulose		S.	0,5	0,5		0,5
Sedoheptulosephosphat		0,5	1,5	0,5		g.S.
Fructose		S.	S.	0,5		0,5
Alanin	1,5	6	5	Peptid	1,5	Peptid
Glutaminsäure	0,7	3	3		1	
Glycin	S.	3	3		0,5	
Valin		2,5	2,5		0,5	
Leucin		2	2		0,7	
Asparaginsäure	g.S.	1,5	1,5		g.S.	
Brenztraubensäure	g.S.	g.S.	2	1,5	g.S.	1
α -Ketoglutarsäure		S.	0,7	1	S.	1
Acetessigsäure	g.S.	g.S.	1	g.S.		g.S.
Phosphat	0,7	2	2	4	2	4,5

Unterschied bei Acetessigsäure das drei- bis sechsfache, bei α -Ketoglutarsäure das zwei- bis vierfache ausmachen.

Mit dem Verschwinden des Zuckers aus dem Substrat erfolgt dann zunächst ein gewisser Ausgleich, der durch Autolyse vervollständigt wird. Zum Zeitpunkt der Erschöpfung von C- und N-Quellen wird in

Standkulturen neben den α -Ketosäuren vor allem Bernsteinsäure ausgeschieden, während Schüttelkulturen nur geringe Mengen von Säuren im Mycel ansammeln, ohne sie auszuscheiden.

Bei Betrachtung der sekundären Stoffe werden diese Unterschiede noch eingehend besprochen, da sie wahrscheinlich für deren Synthese sehr wesentlich sind.

6. Der Einfluß von Stoffwechselgiften mit verschiedenen Angriffspunkten wurde auf Normalsubstrat geprüft, in der einen Versuchsserie mit NH_4NO_3 , in der anderen mit Asparagin als N-Quelle. Da allein der Asparaginsäure-Ansatz 28 Versuchsreihen mit je drei verschiedenen Pilzen umfaßt, wird von einer tabellarischen Zusammenstellung der Ergebnisse abgesehen, doch werden diese nachfolgend kurz summarisch wiedergegeben.

Die Inhibitoren (siehe Methodik) beeinflussen in verschiedenen Konzentrationen die Ausscheidung der primären Stoffe bei *Cer. coer.* und *End. vir.* nicht spezifisch. Der Vorgang scheint unter diesen Bedingungen fast ausschließlich eine Funktion des Wachstums zu sein. Der Grund für die relativ geringen Veränderungen, welche die Verabreichung von Hemmstoffen hervorrufen, liegt in der Möglichkeit der Zelle, verschiedene Wege des Stoffwechsels zu benützen (BOSE 1955). Darüber hinaus werden einige Inhibitoren auch von den Pilzen verändert. Im vorliegenden Falle trifft dies mit Sicherheit bei As_2O_3 und As_2O_5 durch *Lent. lep.* und bei DNP durch die beiden Ascomyceten zu.

Im Bereiche der angewendeten Konzentrationen hemmen KCN, NaF und Fluoracetat das Wachstum der beiden Ascomyceten nicht, bei As_2O_3 wird durch höhere Konzentrationen zwar die Wachstumsgeschwindigkeit etwas reduziert, jedoch das volle Mycelgewicht erreicht. DPA und DNP beeinflussen in den niederen Konzentrationen das Wachstum kaum, während sie es in den höchsten völlig unterbinden. As_2O_5 dagegen reduziert das Mycelgewicht mit steigender Konzentration immer stärker, bis schließlich mit derselben Glucosemenge nur noch ein Viertel des normalen Mycelgewichtes erreicht wird.

Auf *Lent. lep.* wirken die Inhibitoren zum Teil in anderer Weise. Zwar ist die Ausscheidung der primären Stoffe im wesentlichen qualitativ unverändert, gegenüber *Cer. coer.* und *End. vir.* fällt jedoch auf, daß kurz vor dem völligen Verbrauch der Glucose in DNP- und Fluoracetathaltigen Kulturen die α -Ketosäuren fast restlos aus dem Substrat verschwunden sind.

Im Gegensatz zu den beiden Ascomyceten bewirkt in *Lent. lep.*-Kulturen As_2O_5 ein schnelleres Wachstum und eine Erhöhung des Mycelgewichts, selbst in höheren Konzentrationen. Auch in niederen As_2O_3 -Konzentrationen ist das Myceltrockengewicht im Vergleich zu den Kontrollen etwas erhöht und sinkt erst bei 4 mg in 100 ml Nährlösung

unter das Normalgewicht. Bei Zugabe von NaF ist das Wachstum unbeeinflusst, KCN reduziert in höheren Konzentrationen das Mycelgewicht nur wenig, DPA etwas stärker und Fluoracetat sogar bis auf ein Sechstel des Normalgewichts. DNP verhindert in der höchsten Konzentration wie bei *End. vir.* und *Cer. coer.* jedes Wachstum.

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß bei *Lent. lep.* die niederen Carbonsäuren auffälliger in Erscheinung treten als bei den anderen beiden Pilzen. In den Hemmstoffversuchen kommt dies besonders deutlich zum Ausdruck. Mit DNP, KCN, NaF oder DPA im Nährmedium sind in Substrat und Mycel außer Amino- und α -Ketosäuren keine weiteren Säuren nachweisbar. Mit As_2O_3 und As_2O_5 dagegen treten sie gegen Ende des Wachstums im Mycel auf. In Fluoracetathaltigen Kulturen erscheinen sie auch im Substrat. Darüber hinaus bewirken As_2O_3 und As_2O_5 die Ansammlung von Sedoheptulose im Substrat, worauf später noch eingegangen werden soll.

7. Die Faktoren, die die Permeabilität beeinflussen, werden im Zusammenhang mit der Guttation eingehend besprochen. Während die Temperatur neben einer Verlangsamung oder Beschleunigung des Stoffwechsels auch eine gewisse Verlagerung der Stoffwechselschwerpunkte bewirkt, scheint die Ausscheidung der freien primären Produkte davon unbeeinflusst zu bleiben.

Bei Zusätzen von Mineralsäuren oder lipoidlöslichen Stoffen, die eine gewisse Wirkung auf die Plasmapermeabilität besitzen (SPRECHER 1959a), ist das Ergebnis ein verschiedenes. Es hängt ab vom Alter des Mycels, dem diese Verbindungen zugesetzt werden, und von der Einwirkungsdauer. Besonders groß war der Unterschied gegenüber der Kontrolle dann, wenn den Kulturen kurz vor dem völligen Zuckerverbrauch derartige Stoffe zugesetzt wurden und eine Analyse 1–2 Tage danach erfolgte. Die Wirkung glich im wesentlichen einer vorverlegten Autolyse, was sich besonders hinsichtlich der freien Aminosäuren bemerkbar machte. Sie waren dann im Mycel nur noch gering, im Substrat hingegen sehr stark nachweisbar. Besonders augenfällig war dies bei Zusatz von HCl, etwas weniger stark bei Methylheptenon und wesentlich schwächer bei Äther und Äthanol. Noch wachsende Kulturen adaptierten sich in der Regel nach kurzer Zeit an das neue Milieu, die permeabilitätssteigernde Wirkung war dann meist völlig wieder aufgehoben. HCl- und in geringerem Maße Methylheptenon-Zusatz führten allerdings oft zu einem völligen Wachstumsstillstand. Unter diesen Umständen starb das Mycel schließlich ab.

B. Ausscheidung außerhalb des Substrates und Guttation

Erhebt sich der Pilz mit seinen Lufthyphen über das Substrat, so wird für die betreffenden Zellen die Möglichkeit eingeschränkt, in direktem

Stoffaustausch mit dem Substrat zu bleiben. Abgesehen von gasförmigen Molekülen, muß nunmehr die Aufnahme von Verbindungen über die Substrathyphen gehen, während die Ausscheidung von Stoffen nur noch in den Luftraum oder zwischen die Hyphen des Mycels fortgesetzt werden kann. In beiden Fällen verweilen die Stoffe entsprechend ihrem Dampfdruck bzw. ihrer adsorbativen Bindung mehr oder weniger lange in direktem Kontakt mit der Hyphenwand. Demgegenüber werden von Substrathyphen ausgeschiedene Verbindungen durch Diffusion in das Substrat von der Hyphenwand entfernt.

Wohl die früheste Beachtung solcher Ausscheidungen — abgesehen von sekundären Stoffen — fand die Guttation (SCHMITZ 1843). Die Ausscheidung primärer Stoffwechselprodukte außerhalb des Substrates findet in der Guttation ihre deutlichste Ausprägung. Diese Erscheinung wurde daher in den Mittelpunkt der nun folgenden Untersuchungen gestellt.

Über Zustandekommen und Bedeutung der Guttation gibt es eine Anzahl experimentell nur teilweise gesicherter Hypothesen (HEYL 1933, KRAMER 1950, SPRECHER 1959a). Sie lassen sich in Beziehung auf die Pilze alle auf wenige Punkte zurückführen: 1. Eine verschiedene Beschaffenheit der Plasmamembran, die unterschiedliche Permeabilitätsverhältnisse bedingt. 2. Ungleiche Verteilung osmotisch wirksamer Substanzen in oder auf der Zellwand. 3. Ungleiche osmotische Kräfte an entgegengesetzten Seiten innerhalb der Zelle. 4. Quellung und Entquellung der Zelle oder von Zellbestandteilen. 5. Elektrische Potentialdifferenzen. Kürzer ausgedrückt ist die Ursache der Guttation im Stoffwechsel, in der Beschaffenheit der Plasmamembran, in osmotischen oder in kolloidchemisch wirksamen Zuständen zu suchen.

Die Ansichten über die Bedeutung der Guttation reichen von der Eliminierung überschüssigen Wassers über den Transport von Nährsalzen bis zur Ausscheidung von Ballaststoffen.

In Fortführung früherer Untersuchungen (SPRECHER 1959) soll in folgendem versucht werden, weiteres Material zum Verständnis dieser Erscheinung beizutragen. Soweit dies zur Klärung bestimmter Befunde an *Cer. coer.*, *End. vir.* und *Lent. lep.* dient, werden daneben auch eigene Beobachtungen an anderen Pilzen mitgeteilt. Über Vorkommen und Lokalisierung der Guttation bei Pilzen unterrichtet eingehend SPRECHER (1959, 1960).

Wasserwanderung im Mycel. Einige Beobachtungen, vor allem an abgestorbenem und lebendem *Lent. lep.*-Mycel weisen darauf hin, daß sowohl die Wasserwanderung als auch das Austreten von Tropfen durch capillare Räume zwischen den Hyphen und in quellungsfähigen Hyphenwänden erfolgen kann. Für die intercelluläre Wasserwanderung in Basidiomyceten-Fruchtkörpern konnte bereits PIESCHEL (1924), für die

Flüssigkeitsausscheidung durch Mycelien KNOLL (1912) Hinweise erbringen. Schon JAHN (1932) beobachtete, daß Ascomycetenhyphen auf Glasoberflächen in ihrem eigenen Ausscheidungswasser wachsen können. Dies trifft in verschiedenen Substraten auch für die hier untersuchten Pilze zu.

Noch auffallender als die Guttation bei aus dem Substrat herausragenden Hyphen ist sie an den frei zwischen Substrat und Glaswand an dünnen Hyphenfäden hängenden Sklerotien von *Lepiota lutea*. Hier können die Tropfen die Größe des Sklerotiums sogar übertreffen. Eine derartig starke Guttation bei oft sehr geringen Transportmöglichkeiten legt bei den einfach organisierten Pilzen die Frage nach der Wasserleitung nahe. Unter den Methoden, diese zu untersuchen, boten sich vor allem Translokationsversuche und die Markierung des Wasserweges durch Farbstoffe an (STRUGGER 1949).

Wie schon HÜLSBRUCH (1956) bemerkt, ist die Verlagerung bestimmter Stoffe nicht unbedingt mit einer gleichzeitigen Wasserwanderung gekoppelt, doch muß der Translokation der untersuchten Nahrungsbestandteile ein Wasserweg zugrunde liegen, der mindestens die potentielle Wasserwanderung einschließt.

Gegenüber den Kontrollen translocierten alle drei Pilze wichtige Nährstoffe in verschiedenem Maße, wobei das Wachstum auf C-freiem Substrat mit Abstand am geringsten ist. Dies deutet darauf hin, daß trotz des deutlich nachweisbaren Transportes von Kohlenstoffverbindungen diese wesentlich schneller verbraucht als nachgeführt werden. Bei *End. vir.* werden Phosphat- und Stickstoffverbindungen nahezu in dem Maße translociert, wie sie verbraucht werden, was bei *Cer. coer.* und insbesondere bei *Lent. lep.* nicht so deutlich der Fall ist. Die Befunde zeigen, daß die Translokation von Nahrungsbestandteilen über relativ weite Strecken möglich ist. Die Beziehungen zur Wasserwanderung ergeben sich aus der Arbeit von SCHÜTTE (1956), der an mehreren Pilzen feststellte, daß bei einer kräftigen Transpiration auch eine starke Translokation vorliegt.

Tuscheversuche an getrocknetem *Lent. lep.*-Mycel zeigen zwar ein Aufsteigen und Ausscheiden des Wassers durch Mycel und Stipuli, doch wurden auch im Verlaufe von mehreren Monaten keine Tuschepartikel durch das unverletzte Mycel transportiert. Der früher beobachtete Tuschetransport (SPRECHER 1959a) war nur an Mycel reproduzierbar, das bei Zufügung der Tuschelösung noch nicht völlig vertrocknet und unten etwas angerissen war.

Weitere Einblicke in das Problem der Wasserleitung waren von der Anwendung fluoreszierender Farbstoffe zu erwarten.

Über die Schwierigkeiten und Fehlerquellen dieser Methode ist schon viel veröffentlicht worden (STRUGGER 1949, HÜLSBRUCH 1956, BUTTER-

FASS 1956). Ihre Anwendung bei den drei Pilzen wurde darüber hinaus noch durch Eigenfluoreszenz der Ausscheidungen während bestimmter Wachstumsperioden erschwert. Als besonders geeignet für die vorliegende Untersuchung erwiesen sich Natrium-Fluorescein und Berberinsulfat, weil diese die Beobachtung über einen weiten pH -Bereich möglich machen (JOHANNES 1940). An Oberflächenmycel von *Cer. coer.* und *End. vir.* ergaben sich dabei im Verlauf der gesamten Wachstumsperiode folgende Befunde:

1. Bei einem langsam von unten her feucht und dunkel werdenden Oberflächenmycel kann man diesen Vorgang durch die fortschreitende Ausbreitung der Fluoreszenz deutlich sichtbar machen.
2. Die ersten Guttationstropfen, vor allem an sehr jungem Mycel, zeigen zunächst noch keine Fluoreszenz.
3. In derselben Kultur unterscheidet sich meist langwolliges Mycel von kurzwolligem durch verschiedene Leitfähigkeit für Fluorescein, doch läßt sich keine allgemeine Regel ableiten, in welchen Hyphen grundsätzlich der Farbstoff rascher wandert.
4. Zwischen der Größe der Guttationstropfen und der Stärke der Fluoreszenz besteht in der gleichen Kultur oft keine Beziehung. In solchen Fällen hat im allgemeinen der Tropfen die geringste Fluoreszenz, der vom farbstoffhaltigen Substrat am weitesten entfernt ist, wodurch die gegenüber dem Fluorescein bevorzugte Wanderung des Wassers bewiesen ist.
5. Impfstücke zeigen vor allem auf festen Nährböden eine ausgesprochen gute Leitfähigkeit für den Farbstoff, sowohl von unten nach oben, als auch, wie Translokationsversuche zeigen, über mehrere Zentimeter hin nach der Seite. Dabei leiten alte Impfstücke in Übereinstimmung mit später noch mitzuteilenden Befunden besser als junge.
6. Ein unmittelbarer Zusammenhang von Nährstoff-Transport und Farbstoffwanderung konnte nicht nachgewiesen werden.

Mit Berberinsulfat wurden bei *Cer. coer.* und *End. vir.* etwas abweichende Ergebnisse erzielt. Die angewandte Farbstoffkonzentration wirkte vor allem auf *Cer. coer.* schädigend, und das Anwachsen auf berberinsulfathaltigen Nährlösungen war zeitlich sehr stark verzögert (2—3 Monate an Stelle von 2—3 Tagen). Im Gegensatz zu den Versuchen mit Fluorescein sind es fast ausschließlich die Hyphenwände, die fluorescieren und zwar auch dort, wo keinerlei Guttation auftritt. Ferner ist diese Erscheinung nur bei kurzwolligem Mycel zu beobachten, während das langwollige keine Fluoreszenz zeigt.

Mit den gleichen Methoden konnten bei *Lent. lep.* keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Daraufhin wurden völlig eingetrocknete Kulturen mit jeweils einem der beiden Farbstoffe versetzt und das bereits abgestorbene Mycel normalen Kulturbedingungen unterworfen. Schon nach 1 Tag traten deutlich gefärbte und ungefärbte Tropfen an Mycel und Stipuli auf. Während aber die Tropfen an den Mycelien auf

Fluoresceinlösung sofort fluoreszierten, konnte dieses Phänomen bei den Mycelien auf Berberinsulfat erst nach 3 Tagen und je nach Entfernung zwischen Farbstofflösung und Ausscheidestelle verschieden schnell beobachtet werden. Auch hier fluoreszierten im Gegensatz zu Fluorescein vor allem die Hyphenwände des Pilzes.

Besonders aufschlußreich war die Untersuchung der Stipuli. Der mehrschichtige Aufbau dieser auffallenden Gebilde zeigt eine ganz verschiedene Verteilung der Farbstoffe. Obwohl die Stipuli beträchtlich variieren können je nach Alter und Größe und in Wuchsform und Aufbau, läßt sich doch in jedem Fall eine Rindenschicht und ein deutlich davon verschiedener Zentralkörper feststellen. Die äußere Rindenschicht besteht aus hellen, dünnwandigen Hyphen in relativ lockerer Anordnung, der Zentralkörper aus nur wenig kräftigeren, aber etwas dichter gepackten Hyphen mit einem braunen Exkret. Beide Schichten werden durch eine schmale Zone getrennt, deren kräftige, derbwandige Hyphen dicht aneinanderliegen. Diese Zone weist die meisten braunen Ausscheidungen auf, die in organischen Lösungsmitteln fast unlöslich sind und sowohl innerhalb als auch außerhalb der Hyphen auftreten.

Untersucht man das Vorkommen des Fluoresceins an verschiedenen alten und verschiedenen großen Stipuli und vergleicht dabei die Querschnitte von unten bis zur Spitze, so läßt sich in dem dichten braunen Zentralgewebe weder der jungen Stipuli, noch der Spitzen älterer Stipuli der Fluoreszenz-Farbstoff nachweisen. Dagegen reichert er sich in den unteren zentralen Teilen älterer Stipuli und in der inneren Rindenschicht aller Stipuli deutlich an. In und auf den Spitzen kommt es schließlich zu einer kräftigen Akkumulation des Farbstoffs. Schräg stehende Stipuli leiten ihn bevorzugt an der nach unten gerichteten Seite.

Damit scheint die Farbstoffwanderung in totem Stipuligewebe sowohl in den relativ großen Hyphenzwischenräumen der unteren Teile alter Stipuli, als auch in den Rindenteilen aller Stipuli bis zur Spitze zu erfolgen.

Modellversuche an dicken Filtrierpapierplatten (SS 2181) zeigen jedoch, daß schon bei der geringsten Verdunstungsmöglichkeit für das Wasser die Anreicherung der gelösten Stoffe in der Peripherie erfolgt, auch wenn die Leitung im ganzen Querschnitt stattfand. Damit erscheint es möglich, daß die Wasserwanderung zunächst im gesamten Stipulus-Querschnitt gleichmäßig vor sich geht, durch die laufende Evaporation aber eine Konzentrierung gelöster Stoffe in der Peripherie erfolgt. Außerdem übt natürlich die Wachstumszone einen Sog auf Wasser und Nährstoffe aus.

Eine gewisse Stütze für diese Schlüsse ist die Anreicherung der Exkrete in der inneren Rindenschicht und die Fluoreszenz-Farbstoff-

verteilung in älteren Stipuli, insbesondere aber die Befunde von URSPRUNG u. BLUM (1925) bei ihren Saugkraftmessungen an einigen Hutpilzen. Damit erscheint die Nachprüfung der Folgerungen notwendig, die PIESCHEL (1924) aus seinen Versuchen über den Wassertransport in Hymenomyceten-Fruchtkörpern zog. Allerdings ist dabei zu bedenken, daß eine Anreicherung bestimmter Stoffe in der Peripherie mit der Zeit auch eine Bevorzugung gewisser Schichten als Wasserweg bewirken kann.

Das Berberinsulfat wandert unter denselben Bedingungen in den Stipuli sehr viel langsamer. Da es von den Hyphenwänden sehr stark festgehalten wird, kommt es vor allem zu einer Akkumulation in den unteren Teilen. Diese Befunde stehen in einem gewissen Gegensatz zu denen von ROBERTS (1950), der in alten Fruchtkörpern einiger Agaricaceen keine Fluoresceinwanderung feststellte. Auch PLUNKETT (1958) konnte in nicht wachsenden oder abgetöteten Fruchtkörpern von *Polyporus brumalis* keine Farbstoffwanderung nachweisen.

Ein Teil dieser Differenzen erklärt sich aus der Tatsache, daß in den vorliegenden Untersuchungen getrocknete Stipuli verwendet wurden, die in relativ kurzer Zeit Wasser und damit den Farbstoff aufsogen. Da es unter diesen Bedingungen jedoch zu einer scheinbaren Guttation auf Mycel und Stipuli kam, können diese Ergebnisse dazu dienen, die Möglichkeit einer rein osmotischen Auslösung der Wasserwanderung und der Guttation zu beweisen. Die Folgerungen, die SCHÜTTE (1956) aus seinen Untersuchungen an einigen Agaricaceen zog, erhalten dadurch eine gewisse Einschränkung, daß seine „vitale“ Komponente der Translokation wohl Ursache, nicht aber unbedingt auslösender Faktor sein muß, da sie zwar ein osmotisches Gefälle schafft, dieses aber auch noch nach Aufhören vitaler Prozesse vorhanden sein kann.

Bezüglich der Untersuchungen an lebendem Mycel stimmen die beiden zitierten Arbeiten durchaus mit den eigenen Befunden überein. Danach wird durch die Transpiration die Translokation von Nähr- und Farbstoffen gefördert, während die Stoffwechselvorgänge vor allem der jungen lebenden Zelle die Translokation auch über den Transpirationssog hinaus aufrecht erhalten. In diesen Fällen erweist sich die Guttation unter Umständen nicht nur als Vorgang, der sich aus den Stoffumsetzungen heraus ergibt, sondern auch als translokationsfördernder Prozeß.

Faktoren, die die Guttation beeinflussen

a) *Relative Luftfeuchtigkeit.* Es wurde bereits darauf hingewiesen (SPRECHER 1959a), daß der relativen Luftfeuchtigkeit eine wesentliche Rolle bei der Auslösung der Guttation zukommt. Weitere Versuche konnten die Bedeutung dieses Faktors bestätigen und ermöglichten eine Abgrenzung gegenüber anderen Faktoren.

Die Grundlage zum Verständnis der Guttation bildet ihre Beziehung zur Transpiration. Über diesbezügliche Untersuchungen an Pilzen berichtet STOCKER (1956). Durch Vergleich von Champignonfruchtkörpern mit Gipsmodellen gelang es SEYBOLD (1932) zu zeigen, daß in ruhiger Luft, wie sie für Normalkulturen zutrifft, Transpiration und Evaporation hinter der Wassernachlieferung der Hyphen zurückbleibt.

Durch Einbringen wasserentziehender Mittel (H_2SO_4 , NaOH) in den Luftraum der Kulturgefäße konnte sowohl natürliche, als auch künstlich hervorgerufene Guttation unterdrückt oder mindestens reduziert werden. In gleicher Weise wirkte Durchsaugen von steriler Zimmerluft durch die Kulturgefäße. Bei vorsichtigem Absaugen der feuchten Luft trat die Guttation auch nach mehrmaliger Entfernung der Tropfen auf. Um sicherzustellen, daß nur die Verminderung der relativen Luftfeuchtigkeit die Guttation zum Erliegen bringt und nicht etwa die gleichzeitige Entfernung gegebenenfalls die Guttation auslösender gasförmiger Substanzen (CO_2 , Methylheptenon) durch Luftumwälzung, wurde in weiteren Versuchen wasserdampfgesättigte Luft durchgesaugt. Hierbei kam es sogar zu einer Förderung der Guttation.

Durch Einhaltung einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit (siehe Methodik) in den Kulturgefäßen konnten bei *End. vir.* und *Cer. coer.* weitere interessante Aufschlüsse über das Guttationsgeschehen erhalten werden. Die stärkste Tropfenausscheidung tritt erwartungsgemäß bei 100% relativer Luftfeuchtigkeit ein. Bereits bei 97% und selbst noch bei 99% relativer Luftfeuchtigkeit war in den meisten Fällen mit dem bloßen Auge keine Guttation mehr festzustellen. Beobachtungen im Stereomikroskop ergaben jedoch mindestens geringe Flüssigkeitsausscheidung von Lufthyphen an nicht zu exponierten Stellen bis herab zu einer relativen Luftfeuchtigkeit von 76% im Kulturgefaß. Die Versuche erbrachten bei längerer Beobachtungszeit folgende Befunde:

1. Die Guttation ist bei jungen Hyphen im wesentlichen eine Begleiterscheinung wasserdampfgesättigter Luft.
2. Selbst, wenn der Luftraum über dem Mycel eine beträchtlich unter dem Sättigungspunkt liegende relative Luftfeuchtigkeit aufweist, kann zwischen den Hyphen eines kräftig wachsenden und atmenden Mycels Wasserdampfsättigung der Luft vorliegen und an diesen Stellen Guttation eintreten.
3. Unter sonst gleichen Bedingungen guttieren diejenigen Hyphen bevorzugt, die etwas vom Substrat entfernt auf Fruchtkörperansätzen, an Randwülsten und an der Glaswand sich befinden.
4. Außerordentlich starke Ausscheidung großer Tropfen findet an Hyphen statt, die in dest. Wasser einwachsen.
5. Bei älteren Lufthyphen lassen sich, im Gegensatz zu den jüngeren, mit einer etwa 40fachen Vergrößerung auch noch bei einer relativen Luftfeuchtigkeit um 80% Tropfen oder Feuchtigkeit auf den Hyphen

feststellen. 6. Versuche, bei denen über dem Mycel ein Konvektionsströmungen begünstigender großer Luftraum war, führten bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97, 98 und 99% selten zur Guttation. Unter guttationsfördernden Bedingungen, z. B. durch eine *Penicillium*-Infektion, konnte sie jedoch auch hier erreicht werden.

Die starke Tropfenausscheidung über dest. Wasser weist enge Beziehungen zu früheren Befunden über osmotische Guttationsbeeinflussung auf (SPRECHER 1959a). Die Wasserausscheidung bei nicht sehr hoher relativer Luftfeuchtigkeit ist aus den Ergebnissen der 1. Mitteilung zunächst nicht verständlich. Ein Analogiefall dazu ist jedoch das Feuchtwerden älterer Impfstückhyphen. In der Tat konnte auch in der Folge auf totem, altem Mycel von *End. vir.* und insbesondere von *Lent. lep.* durch wasserdampfgesättigte Luft kräftige Tropfenbildung induziert werden. Darüber hinaus konnte durch längeres Einstellen dieser Mycelien in Gefäße mit abgestufter relativer Luftfeuchtigkeit ein Gleichgewicht zwischen ausgeschiedener hygroskopischer Substanz auf den Hyphen und der umgebenden gesättigten Salzlösung hergestellt werden. Auf *Lent. lep.*-Mycel trat unter diesen Umständen noch bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 93% Tropfenbildung ein. Feucht und dunkel gewordene Hyphen trockneten bei diesem Pilz auch in einer relativen Luftfeuchtigkeit von 76% nicht völlig ab.

Es soll, dem Sprachgebrauch folgend, als Guttation zwar nur die Tropfenausscheidung aus lebenden Zellen angesehen werden, doch bestehen durch die osmotische Komponente Beziehungen zwischen der echten Guttation und dem oben geschilderten Auftreten von Tropfen an totem Mycel.

Um vor allem durch die Anreicherung osmotisch aktiven Materials hervorgerufene Tropfen handelt es sich beim Wandmycel, das nur durch relativ wenige Hyphen mit dem Substrat verbunden ist. Trotz geringerer Luftfeuchtigkeit in seiner Umgebung weist es mehr Tropfen auf als gleichaltes Oberflächenmycel. Das gleiche gilt für die Tropfenausscheidung auf und an Stipuli.

Damit ist die Möglichkeit einer Guttation in nicht wasserdampfgesättigter Luft mindestens bei älteren Hyphen gegeben. Die Reproduzierbarkeit des Auftretens von Tropfen an totem Mycel legte eine Überprüfung des Vorgangs in einem Modellversuch nahe. Als geeignetes Material erwies sich Wundwatte. An ihren herausragenden Faserspitzen traten in wasserdampfgesättigter Luft Wassertropfen auf. Behandlung der Watte mit HCl-Dampf bewirkte diesen Effekt auch in etwas geringerer Luftfeuchtigkeit. Eine Analogie mit dem Pilzmycel war auch noch dadurch gegeben, daß, ähnlich wie bei den Lufthyphen, Tropfen nur an den völlig freien Faserenden der Watte entstanden. Wurde sie dichter gepackt oder die Faserenden eingeschlagen, sog sich die Watte ohne jede Tropfenbildung voll.

b) *Temperatur.* Weitere Versuche bestätigten die schon früher (SPRECHER 1959a) mitgeteilten Ergebnisse, wonach erhöhte Temperatur innerhalb gewisser Grenzen eine Steigerung und in vielen Fällen eine Auslösung der Guttation nach sich zieht. Vergleichende Beobachtungen bei verschiedenen Temperaturen lassen den Schluß zu, daß es vor allem die durch die Temperaturerhöhung gesteigerte Stoffwechseltätigkeit ist, welche zu vermehrter Wasserausscheidung führt. Dabei handelt es sich sicher am wenigsten um in chemischen Umsetzungen freigewordenes Wasser (WEIGL 1960), vielmehr dürfte die Guttation durch eine verstärkte Wasseraufnahme und die sich daraus ergebende Störung der Wasserbilanz zu erklären sein. Als zusätzliche Komponente käme allerdings auch eine temperaturbedingte Permeabilitätssteigerung in Frage (WARTIOVAARA 1956). Eine solche ist im Bereich der untersuchten Temperaturen jedoch sicher von geringer Bedeutung, da die vergleichende chromatographische Untersuchung der Ausscheidungen in das Substrat nur entwicklungsbedingte Unterschiede aufweist. Inwieweit schließlich eine örtliche Erwärmung des Mycels durch die Stoffwechseltätigkeit bei der Guttation mitwirkt, muß für den Bereich normaler Temperaturen zunächst noch offen bleiben, während ihr um 4°C eine gewisse Wirkung zukommt. Da jedoch unter diesen Bedingungen bereits durch geringe Temperaturschwankungen Wasserdampfsättigung und damit Tropfenbildung durch Kondensation auch an Watte eintritt, kann von einer echten Guttation nur gesprochen werden, wenn ein zunächst völlig tröpfchenfreies Mycel bei konstanter Außentemperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ nach einigen Tagen Tröpfchen ausscheidet. Auf *End. vir.*-Mycel war dies mehrfach der Fall, seltener bei *Lent. lep.* und kaum bei *Cer. coer.* Möglicherweise liegt dies an einer verschieden starken Sistierung des Stoffwechsels durch die niedere Temperatur.

c) *Beleuchtung.* Bestrahlung der einen Hälfte des Mycels durch eine 100 W-Birne im Abstand von 30 cm und Abdecken der anderen Hälfte durch mehrere Lagen von dickem, weißem Papier führte bei *End. vir.* und *Lent. lep.* zu einer bevorzugten und oft ausschließlichen Guttation entlang der Trennungslinie zwischen Licht und Schatten. Obwohl auf der bestrahlten Seite die Deckel der Petrischalen sehr stark beschlagen waren, zeigte das darunter liegende Mycel bei *End. vir.* keine, bei *Lent. lep.* nur gelegentlich eine Guttation. Die Temperatur wurde bei den Versuchen immer zwischen 25° und 30°C gehalten, das Temperaturintervall betrug zwischen beleuchteter und abgedeckter Fläche bei den verschiedenen Versuchen 3° bis 5°C . In Übereinstimmung mit früheren Befunden (SPRECHER 1959a) und durch den Vergleich mit entsprechenden Versuchen an Watte, die unter diesen Bedingungen eine ganz andere Tröpfchenverteilung aufwies, läßt sich das Ergebnis durch zwei Faktoren erklären. Die Temperatur war auf der beleuchteten Seite zwar für

die Auslösung der Guttation besonders geeignet, doch hemmte hier gleichzeitig die hohe Lichtintensität, woraus die bevorzugte Tropfenausscheidung auf der Grenzlinie verständlich wird. Die Hemmung der Guttation durch das Licht ist nicht mit einer Abtötung des Mycels verbunden. Selbst nach einer Bestrahlung von 3 Wochen läßt sich bei *Lent. lep.* durch Temperaturen um 28° C im Dunkeln noch eine gleichmäßige Guttation auf beiden Seiten des Mycels erzielen. Eine UV-Bestrahlung über 2 Std führt bei *End. vir.* anschließend zu einer verstärkten Guttation, bei *Cer. coer.* tritt keine Veränderung auf. Inwieweit es sich bei der Tropfenausscheidung nach UV-Bestrahlung um eine prämortale Permeabilitätserhöhung (BIEBL 1943) handelt, war nicht eindeutig festzustellen.

d) *Chemische Zusätze.* Durch Zusätze von Verbindungen, die die Oberflächenaktivität, den pH-Wert oder den Chemismus der Zellwand bzw. der Plasmamembran beeinflussen, kann auch eine Wirkung auf die

Tabelle 9. Zahl der Kulturen, die bei Einwirkung flüchtiger Verbindungen in Dampfform Tröpfchen auf dem Luftmycel aufweisen

Zugesetzte Verbindung	Zwischen Zusatz und Beobachtung verflossene Zeit							
	6 Std	1 Tag	2 Tage	4 Tage	6 Tage	10 Tage	14 Tage	20 Tage
ohne Zusatz	—	—	—	—	—	2	2	4
Methylheptenon	—	—	—	—	—	2	4	4
Äther	—	—	—	—	—	3	4	4
rauchende HCl	4	4	4	4	4	4	4	4

Guttation ausgeübt werden (SPRECHER 1959). Weitere Versuche sollten frühere Befunde sichern und die Wirkung einzelner Faktoren genauer analysieren.

Bei der direkten Zugabe solcher Substanzen zu wachsenden Mycelien der drei Pilze hatte es sich gezeigt, daß Äther, Chloroform, Methylheptenylketon und Methylnonylketon eine relativ geringe guttationsfördernde Wirkung ausüben. Um die vielfach schädigende Wirkung direkter Zugaben dieser Substanzen auf die damit unmittelbar in Berührung kommenden Zellen auszuschließen, wurden weitere Versuche so angesetzt, daß diese Verbindungen nur noch dampfförmig zur Einwirkung kamen, was durch Einstellen kleiner Reagensgläser mit der betreffenden Substanz in die Kulturgefäße erreicht wurde.

Die Ergebnisse bestätigen im wesentlichen die Befunde, die schon bei direkter Zugabe der betreffenden Stoffe zu den Kulturen erhalten wurden. Sehr deutlich kommt dies bei jeweils vier gleichen *Lent. lep.*-Kulturen, die alle bei 28° C gehalten wurden, zum Ausdruck (Tab. 9).

Es fällt auf, daß die Guttation in einem bestimmten Entwicklungsabschnitt des Pilzes ohnehin einsetzt und durch chemische Zusätze

lediglich etwas gefördert werden kann. Nur der HCl-Einfluß ist ein völlig anderer. Modellversuche mit Watte ergaben, daß sich HCl-Dämpfe an den freien Faser- bzw. Hyphenenden bevorzugt kondensieren und es auf diese Weise zur Tropfenbildung kommt. Die durch HCl induzierte, jedoch wesentlich geringere Guttation wird dadurch überdeckt. Neben einer Permeabilitäts-Beeinflussung durch starke pH -Verschiebung muß zur Erklärung der Ursache der vermehrten Tropfenausscheidung durch HCl auch an eine Beeinflussung der Zellkolloide im Sinne von TROSCHEIN (1958) gedacht werden. In diesem Zusammenhang muß auch eine Eliminierung bestimmter Substanzen im Sinne einer „Entgiftung“ erwogen werden, doch entzieht sich diese Annahme insofern der einwandfreien Nachprüfung, als ein Krieeffekt durch die Hyphenwände und damit letzten Endes eine gewisse Verbindung von Guttation und Substrat nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Eine solche Verbindung kann aber nicht unmittelbar sein, weil sich die Tropfen sonst nicht halten können. In diesem Falle würden die Lufthyphen feucht werden und in das Substrat einsinken.

Demgegenüber handelt es sich bei der Wirkung organischer Lösungsmittel und der Methylketone im wesentlichen um eine erhöhte Permeabilität durch Beeinflussung der Lipide in den Plasmagrenzflächen bzw. im Mesoplasma (HÖFLER 1953). Ihre verschiedene Wirkung durch Variieren der Konzentrationen wurden vor allem durch LEPESCHKIN (1906) analysiert. In neuerer Zeit führten unter anderen HÖHN u. ELFERT (1958) an höheren Pflanzen entsprechende Untersuchungen durch.

Die Guttationsversuche bei bestimmter relativer Luftfeuchtigkeit hatten bereits Hinweise darauf gegeben, daß ausgeschiedene Substanzen besonders auf älteren Lufthyphen eine relativ starke wasseranziehende Wirkung entfalten können. Da auch schon früher (SPRECHER 1959a) durch osmotisch aktive Substanzen im Substrat die Guttation bei *Cer. coer.* beeinflußt wurde, sollte nunmehr die osmotische Komponente dieses Vorgangs in Zusammenhang mit der möglichen Rolle zweier antagonistischen Ionen untersucht werden (Tab.10).

Der Tabelle läßt sich entnehmen, daß relativ hohe Konzentrationen osmotisch aktiver Substanzen mindestens vorübergehend mit dem Mycel in Konkurrenz um das Wasser treten. Bei KCl-Konzentrationen, welche den Pilz nicht abtöten, ist dieser Vorgang nach einer gewissen Adaptationszeit reversibel. Während gleichaltrige *Lent. lep.*- und *Cer. coer.*-Kulturen unter denselben Bedingungen entsprechend reagieren, passen sich jüngere *Cer. coer.*-Kulturen viel rascher den neuen Verhältnissen an (Tab.11).

Der Rückgang der Guttation des Mycels auf Normalnährlösung und besonders auf dest. Wasser (Tab.10) steht mit dem Absterbevorgang des

Mycels in Verbindung. Demgegenüber zeigt Tab. 11 deutlich neben der rein osmotischen Wirkung eine spezifische Ionenwirkung. Auch ist hier offensichtlich, daß der kräftig wachsende Pilz sich rasch an relativ hohe Salzkonzentrationen gewöhnen kann, wobei sich der Stoffwechsel rasch

Tabelle 10. Veränderung der Guttation durch Verbringen ausgewachsener End. vir.-Mycelien auf Substrate mit verschiedenen Salz-Konzentrationen

Zusatz	Guttation				
	Vor dem Zusatz	Nach dem Zusatz nach			
		2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	10 Tagen
Normalnähr- lösung	mäßige Guttation	kräftig	verstärkt	verstärkt	gering ver- mindert
Dest. Wasser		kräftig	verstärkt	vermindert	vermindert
5% KCl		ohne	ohne	Spuren	Spuren
10% KCl		etwas ver- mindert	ohne	ohne	ohne
10% CaCl_2		ohne	ohne	ohne	ohne

Tabelle 11. Veränderung der Guttation durch Verbringen kräftig wachsender Cer. coer.-Mycelien auf Substrate mit verschiedenen Salzkonzentrationen

Zusatz	Guttation			
	vor dem Zusatz	nach dem Zusatz nach		
		2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen
Normalnährlösung	mäßig	etwas verstärkt	etwas verstärkt	kräftig
Dest. Wasser		verstärkt	kräftig	sehr stark
5% KCl in Normal- nährlösung		mäßig	verstärkt	verstärkt
10% KCl in Normal- nährlösung		mäßig	etwas verstärkt	etwas verstärkt
10% CaCl_2 in Nor- malnährlösung		vermindert	Spuren	ohne

wieder einspielt, wie aus der Analyse der freien primären Stoffwechselprodukte hervorgeht. Nur der CaCl_2 -Zusatz erzwingt bei allen drei Pilzen deutliche Veränderungen in „pool“ und Ausscheidung der freien Aminosäuren.

e) Versuche unter N_2 -Atmosphäre. In Übereinstimmung mit früheren Befunden (SPRECHER 1959a), konnte in N_2 -Atmosphäre bei erhöhter Temperatur eine verstärkte Guttation festgestellt werden. Der damals aus den Versuchen gezogene Schluß, die N_2 -Atmosphäre selbst würde die Guttation begünstigen, kann nach den nunmehr vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht mehr aufrecht erhalten werden. Vergleichende

Analysen der mit dem Guttationswasser ausgeschiedenen Verbindungen, ferner Beobachtungen an Kulturen verschiedenen Alters mit stagnierender oder laufend erneuerter Luft bzw. N_2 -Atmosphäre ergaben bei Temperaturen von 4°, 20° und 28°C, daß der Stickstoff keine unmittelbare Wirkung auf die Guttation ausübt. Die entsprechenden Befunde in N_2 -Atmosphäre ließen sich immer auf das Vorhandensein anderer Faktoren zurückführen. Eine geringe Reduktion der Guttationsleistung gegenüber den Kontrollen konnte lediglich bei älterem Mycel in reiner N_2 -Atmosphäre ohne Wasserdampfsättigung festgestellt werden, was zweifellos auf eine Verminderung der Stoffwechselleistung zurückgeführt werden kann.

Chemische Bestandteile des Guttationswassers

In einer früheren Mitteilung (SPRECHER 1959a) konnte an Analysen der Guttationsflüssigkeit gezeigt werden, daß diese durchaus mit der Stoffausscheidung in das Substrat vergleichbar ist. Auch hier läßt besonders

Tabelle 12. Aminosäureausscheidung von *Cer. coer.* in Substrat und Guttationstropfen unter verschiedenen Bedingungen

Zusatz		Äthanol	HCl	ohne	ohne
		20° C	20° C	28° C	4° C
Substrat:	Alanin	3	3	0,5	2,5
	Glutaminsäure	1,5	1,5	1	1
	Valin	0,7	0,7	Spur	—
	Asparagin	0,7	2	—	0,7
	Glycin	0,5	0,7	—	0,5
	Threonin	0,5	Spur	—	Spur
	Asparaginsäure	1	0,5	Spur	0,5
	Leucin	Spur	—	—	—
Guttation:	Alanin	3,5	2	Spur	0,7
	Glutaminsäure	1,5	0,7	1	0,5
	Valin	1	0,7	1	—
	Asparagin	0,7	1	—	—
	Glycin	0,7	0,7	—	—
	Threonin	0,5	Spur	—	—
	Asparaginsäure	0,7	Spur	g. Spur	Spur
	Leucin	0,5	—	1	—

der Gehalt an Aminosäuren Rückschlüsse auf Alter und Zustand des ausscheidenden Mycels zu.

Weitere Untersuchungen sollten dieses Bild abrunden und gleichzeitig zur Erklärung einiger Befunde beitragen, die durch andere Methoden gewonnen worden waren.

Ein Vergleich der Aminosäuren im Substrat und Guttation weist unter völlig verschiedenen Bedingungen gewisse Parallelen auf (Tab. 12).

Bei allen in dieser Tabelle aufgeführten Kulturen waren Wachstum und Guttation ganz ähnlich. Dies bestätigt die früher geäußerte These, wonach Äthanol und andere organische Lösungsmittel die Permeabilität des Plasmas steigern, was auch für HCl zutrifft.

Erhöhung der Temperatur bewirkt weniger eine Permeabilitäts- als eine Stoffwechselveränderung. Der niedere Aminosäuregehalt von Substrat und Guttationstropfen bei 28°C kommt daher, daß in dieser Kultur der assimilierbare Stickstoff nahezu aufgebraucht ist und damit die ausgeschiedenen Aminosäuren wieder resorbiert werden. Dies ist bei Substrat und Guttationsausscheidung augenscheinlich in unterschiedlichem Maße der Fall.

Bei niederer Temperatur kommt es wohl durch Fehlen normaler Transpiration zu einer Störung der Wasserbilanz. Dies führt im wesentlichen zu reiner Wasserausscheidung, die durch

Kondensationswasser unter Umständen noch etwas vermehrt werden kann, was sich an *Lent. lep.*-Kulturen deutlich demonstrieren läßt (Tab. 13).

Das unterschiedliche Vorkommen gewisser Aminosäuren in Mycel und Substrat ist eine

Tabelle 13
Aminosäuren in Mycel, Substrat und Guttationsflüssigkeit von Lent. lep. bei verschiedenen Temperaturen

		28° C	4° C
Mycel	Asparagin	0,7	0,7
	Alanin	0,5	3,5
	Glutaminsäure	0,5	1
	Valin	0,5	0,7
	Asparaginsäure	Spur	Spur
Substrat	Asparagin	3,5	3
	Glutaminsäure	2	1,5
	Valin	2	—
	Alanin	1,5	0,5
	Asparaginsäure	1,5	1
	Threonin	g. Spur	—
Guttation	Asparagin	3,5	1
	Glutaminsäure	2	0,5
	Valin	2	—
	Alanin	1,5	—
	Asparaginsäure	1,5	—
	Threonin	g. Spur	—

Begleiterscheinung des verschiedenen Entwicklungsstadiums. Die Temperatur wirkte in diesem Falle nur mittelbar durch unterschiedliche Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Die Beobachtung bevorzugter Guttation an den Stipuli, wie auch die Versuche an toten Stipuli beweisen, daß eine ausgezeichnete Wasser- und Substratleitung von unten nach oben stattfindet, die durch laufende Anreicherung ausgeschiedener Substanzen gekennzeichnet ist (Tab. 14). Während der 5,5 cm lange Stipulus bereits einen Überschuß vieler Stoffwechselprodukte aufweist, überwiegt bei dem kleinen 1,3 cm langen Stipulus noch der Verbrauch. Die Analyse der α -Ketosäuren ergab zwar noch Brenztraubensäure und Oxalessigsäure im Substrat, da sie aber nicht in allen Teilen des Pilzes untersucht werden konnten, wurde dieser Befund nicht in der Tabelle aufgeführt.

Infektionen oder zusätzlich in die Kulturen der drei Pilze eingimpfte Schimmelpilze rufen im allgemeinen bei dem sie umgebenden Mycel von *Cer. coer.*, *End. vir.* oder *Lent. lep.* eine kräftige Guttation hervor. Da

Tabelle 14

Freie primäre Stoffwechselprodukte von Lent. lep. auf Normalnährlösung

	Substrat	Guttation	Normales Mycel	Mycel von	
				großem Stipulus	kleinem Stipulus
pH	3,2	4,4	—	—	—
Farbe	gelb	dunkelgelb	—	—	—
Trockengew. der Einzelteile in mg	—	—	182	149	32,5
Glucose	g.Spur	g.Spur	2	1	g.Spur
Fructose	g.Spur	—	—	0,5	—
Sedoheptulosephosphat	—	—	g.Spur	0,7	0,7
Alanin	—	1,5	1	3	—
Glutaminsäure	—	—	0,5	2	0,7
Valin	—	—	1	1,5	—
Leucin	—	—	—	0,7	—
Glycin	—	—	—	0,7	—
Asparaginsäure	—	—	—	0,5	—
Threonin	—	—	—	Spur	—
Apfelsäure	—	3	—	1,5	—
Bernsteinsäure	—	2	—	—	—
Citronensäure	—	—	Spur	0,7	Spur
α -Ketoglutarinsäure	0,5	Spur	—	Spur	2

die Schimmelpilze selbst sehr stark guttieren, besteht die Möglichkeit, daß die dadurch erhöhte Luftfeuchtigkeit auf die Umgebung guttationsauslösend wirkt. Aufschlüsse hierüber waren von der Analyse mit-

Tabelle 15. *Aminosäureausscheidung von Lent. lep. und Penicillium sp. in die Guttationsflüssigkeit und in das Substrat derselben Kultur*

	Substrat	Guttation auf <i>Lent. lep.</i>	Guttation auf <i>Penicillium</i>
pH	7,9	7,6	7,8
Glutaminsäure	1,5	1,5	2
Asparaginsäure	1,5	1,5	—
Alanin	g.Spur	Spur	—
Asparagin	g.Spur	g.Spur	—

ausgeschiedener organischer Stoffe zu erwarten (Tab.15). Vergleichbare Verhältnisse ergaben sich auch bei der Untersuchung von Guttation und Substrat einer Mischkultur von *Penicillium* und *End. vir.*

Die Befunde beweisen, daß der durch Infektion zur Tropfenbildung an

den Lufthyphen veranlaßte Pilz wirklich guttiert. Dabei muß zunächst offengelassen werden, ob ein erhöhter Stoffumsatz in der Nähe der Infektion oder von dieser ausgeschiedene Stoffe eine Rolle spielen. Eine

Auslösung oder Verstärkung der Guttation durch Wasserdampfsättigung der Luft in unmittelbarer Nähe der Infektion muß gelegentlich allerdings ebenfalls in Betracht gezogen werden. Versuche in den verschiedensten Kulturgefäßen hatten nämlich gezeigt, daß über und um Mycel mit intensivem Stoffwechsel eine relative Luftfeuchtigkeit von 100% herrschen kann, auch wenn sie in den übrigen Teilen des Gefäßes geringer ist. Je nach der Art des Pilzes, Umfang des Stoffwechsels und Einfluß bestimmter Faktoren kann eine Wasserdampfsättigung mehrere Zentimeter nach oben und mehrere Millimeter nach der Seite hin vorhanden sein. Da bei Mischkulturen verschiedener Basidiomyceten allerdings Guttation oft genau an den Stellen auftritt, wo sich die beiden allein nicht guttierenden Pilze gegenseitig überwachsen, ist die erhöhte Luftfeuchtigkeit um eine Infektion mit Sicherheit nicht der ausschlaggebende Faktor der Guttationsauslösung.

Diskussion

Über die Ausscheidung stickstoffhaltiger Substanzen durch Mikroorganismen liegt bereits eine ganze Reihe von Arbeiten vor (PFENNIG 1956). Während aber *Hefen* und *Aspergillaceen* in dieser Hinsicht relativ häufig untersucht wurden, fehlt es noch an einer systematischen Bearbeitung dieser Erscheinung an höheren Pilzen.

MEYERS (1958) fand in Schüttelkulturen von *Penicillium* nur geringe Mengen von löslichem Stickstoff außerhalb des Mycels. Demgegenüber waren bei *Cer. coer.*, *End. vir.* und *Lent. lep.* auch unter diesen Bedingungen beträchtliche Mengen von Aminosäuren nachweisbar. Im Gegensatz zu MORTONS Befunden an Schimmelpilzen (1955) konnten jedoch bei den drei untersuchten Organismen nur sehr selten extracelluläre Peptide gefunden werden. Auch trifft die Feststellung MORTONS, der ausgeschiedene N werde nicht mehr mobilisiert, bei diesen Pilzen nicht zu.

Über den Zeitpunkt der Ausscheidung löslicher N-Verbindungen in das Substrat besteht dagegen zwischen den eigenen Befunden und den Ergebnissen anderer Autoren (KATING 1955; MORTON 1955; WHITMORE 1957) an Hefen und Schimmelpilzen völlige Übereinstimmung. Mit Beginn des Wachstums und der aktiven Stickstoff-Assimilation treten bestimmte Stickstoffverbindungen im Substrat auf. Bei *Cer. coer.*, *End. vir.* und *Lent. lep.* sind es immer die „Grundaminosäuren“ Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. Mit dem Verbrauch des dargebotenen C und N sinkt die Menge dieser Substanzen auf ein Minimum ab, um dann während der Autolyse wieder sehr stark anzusteigen. Gleichzeitig werden im Verlauf dieses Prozesses auch alle jene Aminosäuren freigesetzt, die zuvor ausschließlich im Mycel nachweisbar waren. Exakte quantitative Beziehungen zwischen dem Auftreten einzelner Aminosäuren im Substrat und ihrem Verschwinden aus dem Mycel ließen sich

zwar nicht nachweisen, doch liegt dies zweifellos an der Tatsache, daß nicht alle Hyphen gleichzeitig autolysieren. Der bereits erwähnte Unterschied im Vorkommen der Aminosäuren in Mycel und Substrat während des Wachstums wurde auch von TANDON (1957) an *Hefen* und von TOUZÉ-SOULET (1958) an *Hypomyces* beobachtet.

Über die Ursache dieses Phänomens und über die Gründe für das Auftreten bestimmter Aminosäuren im Substrat von Mikroorganismen gibt es eine ganze Anzahl verschiedener Hypothesen.

ROBERTS u. Mitarb. (1955) nehmen bei *E. coli* eine freie Diffusion verschiedener Verbindungen in den „water space“ der Zelle an. Eine daraus ableitbare allgemeine und unspezifische „Überlaufreaktion“ der im Zellinneren angestauten Stoffe erscheint jedoch im vorliegenden Falle ausgeschlossen. Dazu sind die qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen den freien Aminosäuren innerhalb und außerhalb der Hyphen zu groß.

Eine wahrscheinlichere Erklärung bietet sich in der Exosmose der betreffenden Verbindungen an. Die verschiedene Retention bestimmter Stoffe könnte dabei durch spezifische Permeabilitätsunterschiede bewirkt werden. Als bestimmender Faktor für das Auftreten gewisser Aminosäuren im Substrat kommt die Exosmose allerdings bei keinem der drei untersuchten Pilze in Frage, wie Versuche bei Verwendung einzelner Aminosäuren als N-Quelle zeigen. KATING (1955) hatte bei *Endomycopsis* und PFENNIG (1956) bei *Streptomyces* bereits früher die Exosmose als Ausscheidungsmechanismus abgelehnt.

KATING glaubt auf Grund seiner Untersuchungen das Auftreten der Aminosäuren im Substrat durch Stoffwechselvorgänge bei der N-Assimilation unmittelbar an der Zelloberfläche erklären zu können. Da in neuerer Zeit verschiedentlich Fermente in der Zellmembran gefunden wurden (GALE 1959) und ihre Funktion bei Kleinlebewesen als Analogon zur Verdauung angesehen werden kann (NETTER 1959), hat diese Vorstellung sicherlich eine gewisse Berechtigung.

Zieht man zur Klärung der Erscheinung die chromatographische Untersuchung der Guttationsflüssigkeit heran, so ergeben sich jedoch gewisse Einschränkungen hinsichtlich der Herkunft freier Aminosäuren im Substrat aus Vorgängen an der Zelloberfläche. Ein Vergleich zwischen dem Aminosäuregehalt der Guttationstropfen und dem des Substrates ergibt grundsätzliche Übereinstimmung. Zweifellos werden aber bei den Lufthyphen die Aminosäuren nicht als Begleiterscheinung der N-Assimilation an der Zelloberfläche freigesetzt, weil der assimilierbare Stickstoff durch die Hyphen zugeleitet wird. Dieser Befund zwingt dazu, mindestens bei den Lufthyphen eine Ausscheidung aus der Zelle anzunehmen und sie bei den Substrathyphen wenigstens generell als möglich anzusehen. Da KATING sich zellmorphologisch bezüglich des Ortes der Umsetzungen

nicht festlegt, können die von ihm entwickelten Vorstellungen trotzdem auch weiterhin nach gewissen Modifikationen als Diskussionsgrundlage dienen.

In Übereinstimmung mit einer von MANDELSTAM (1958) nach Untersuchungen an *E. coli* postulierten Hypothese entwickelten COWIE u. Mitarb. (1956, 1959) an Hefen gewisse Vorstellungen über den Aminosäure-„pool“, die möglicherweise geeignet sind, zur Klärung des Phänomens beizutragen. Danach liegen die freien Aminosäuren in der Zelle nicht völlig frei vor, sondern sind an einigermaßen spezifischen Orten an Makromolekülen adsorbiert.

Diesem relativ konstanten „internal pool“ steht ein variabler und von exogener Zufuhr abhängiger „expandable pool“ gegenüber. Dadurch lassen sich nunmehr auch die bei der Verabreichung verschiedener Aminosäuren gefundenen Ergebnisse erklären. Der „internal pool“ ergibt die auffällige Konstanz der freien Aminosäuren im Mycel, die unter bestimmten Umständen durch den „external pool“ etwas verdeckt wird. Das Zusammenwirken beider macht schließlich die große Kapazität der Pilze verständlich, völlig verschiedene Substrate ökonomisch auszunützen.

Nach der Hypothese von COWIE entstehen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel zunächst immer die Grundaminosäuren, die im „internal pool“ gebunden und ohne Austauschmöglichkeit mit dem anderen „pool“ oder mit dem Substrat entweder in Eiweiß eingebaut oder transformiert werden. Dies erklärt, warum in der Periode der N-Assimilation nur die Grundaminosäuren im Außenmedium auftreten. Es wäre dies nach COWIE (1959) entweder der Überschuß der nicht vom „internal pool“ erfaßten Verbindungen oder ein echter Verlust durch Abdiffusion. Die sekundär an den Adsorptionsstellen gebildeten Aminosäuren sind unter diesen Umständen nicht frei beweglich. Durch diese Vorstellung wird auch verständlich, weshalb in den vorliegenden Untersuchungen gerade die Grundaminosäuren bei N-Mangel abnehmen, ist doch ihr Umsatz ein wesentlich größerer, da sie die Ausgangssubstanz aller übrigen Aminosäuren darstellen.

Die besondere Rolle der Grundaminosäuren sowohl im Mycel als auch im Substrat kommt auch noch bei verschiedenen anderen Pilzen zum Ausdruck. (SIMONART 1953; PILLAI 1956), ebenso die Konstanz des Aminosäure-„pools“ (FUERST 1957).

Die Arbeit KATINGS (1955) wirft nun die Frage auf, ob Verbindungen, die aus einem exogenen Substrat an der Zelloberfläche entstehen, noch als Ausscheidungen angesehen werden können. Als Kriterium für die Anwendung dieses Ausdruckes gilt in den nachfolgenden Ausführungen die Lokalisierung des Enzymsystems, das die Entstehung der betreffenden Verbindung katalysiert. Als Ausscheidung wird damit jeder Stoff bezeichnet, dessen Entstehung durch direkt mit der lebenden Zelle

verbundene Enzymsysteme katalysiert wird. Diese Ansicht erhält durch die Einbeziehung der Zellwand zum Gesamtorganismus der Zelle seine Berechtigung. Allerdings wird gleichzeitig offenbar, daß von den aus der Zelle ausgeschiedenen bis zu den durch Exoenzyme produzierten Verbindungen alle Übergänge möglich sind. So hatten bereits RIPPEL u. Mitarb. (1938) bei *Bacillus glycinophilus* angenommen, daß gewisse mit der Eisenablagerung zusammenhängende Reaktionen außerhalb des eigentlichen Zellinneren stattfinden. Nicht zu den Ausscheidungen werden hier solche Stoffe gerechnet, die durch Exoenzyme entstehen, oder solche, die durch Autolyse freigesetzt werden.

Die Analyse der Ausscheidungen aus *Cer. coer.*, *End. vir.* und *Lent. lep.* zeigt in Übereinstimmung mit den angeführten Vorstellungen die Diffusion als Mechanismus. Von den Stickstoffverbindungen werden davon nur die Stoffe betroffen, die nicht im „internal pool“ festgehalten werden, aus dem Krebszyclus heraus jedoch im Überschuß anfallen, was etwa dem „overflow“ von FOSTER (1949) entspricht. In ähnlicher Weise kann man sich auch die Ausscheidung der anderen untersuchten Verbindungen vorstellen. Damit läßt sich der ganze Vorgang als passives Abdiffundieren der durch aktiven Stoffwechsel freigesetzten Verbindungen ansehen. Er wird gesteuert durch den Stoffwechsel, die kolloidchemischen Zustände und die Permeabilität der Zelle. Ferner hängt die Stärke der Ausscheidung von dem Konzentrationsgefälle inner- und außerhalb der Zelle ab. Inwieweit nicht osmotische Transportvorgänge (BOGEN 1956) bei der Ausscheidung eine Rolle spielen, wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht nachgeprüft, doch stehen die Theorien der Anionenatmung LUNDEGARDHS (1957), des Transports mittels „carrier“-Aggregaten oder durch Co-Enzymkomplexe nicht in grundsätzlichem Widerspruch zu den oben entwickelten Vorstellungen.

Diese treffen auch weitgehend für die Stoffausscheidung der Luft-hyphen zu. Durch das Fehlen des Substrates und die gleichzeitige Einschränkung des Reaktionsmilieus an den Zelloberflächen finden an ihnen zunächst weniger Stoffumsetzungen statt. Allerdings reichern sich hier im Gegensatz zu den Substrathyphen mit der Zeit die ausgeschiedenen Produkte an. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, kann dies zu einer völligen Inkrustierung, ja Bedeckung der Hyphenwand führen.

In gewisser Beziehung läßt sich auch die Ausscheidung von flüssigem Wasser in dieses Schema einordnen, doch liegt hier nicht nur eine chemische Verbindung vor, sondern gleichzeitig ein Lösungsmittel und Reaktionsmedium. Die Gegebenheiten werden dadurch etwas komplizierter.

BREFELD (1881) und ZOPF (1890) sahen in einer reichlichen Wasseraufnahme einerseits und in der Bildung wasserarmer Sporen und Fruktifikationsorgane andererseits den Grund für den Wasseraustritt bei

Penicillium, *Mucor* und *Pilobolus*. Die Beobachtungen der beiden Autoren konnten bestätigt und durch eigene Befunde an den drei untersuchten Pilzen, an Sklerotien und bei Hymenialbildungen von Basidiomyceten ergänzt werden. Dadurch scheinen weitgehend auch die Folgerungen von BREFELD und ZOPF gerechtfertigt zu sein. Erweitert man jedoch die Betrachtung durch Untersuchung der Guttation an jungen, plasmagefüllten Hyphenspitzen, lassen sich weitgehendere Schlüsse ziehen. Danach hat die starke Stoffwechseltätigkeit schwach vacuolisierte Zellen eine kräftige Wasseraufnahme zur Folge, die bei fehlender Abdunstungsmöglichkeit in wassergesättigter Atmosphäre zu einer Ansammlung von Wassertropfen an den betreffenden Zellwänden führt.

Wie die Befunde zeigen, ist die Wasserführung in den Hyphen außerordentlich gut, so daß auch über weite Strecken der Transport gesichert ist, solange hohe Luftfeuchtigkeit die wasserleitenden Mycelteile vor starker Abdunstung schützt. Die Wasserwanderung folgt sicherlich weitgehend einem durch den Stoffwechsel hervorgerufenen osmotischen Gefälle, wobei die von HÜLSBRUCH (1956) entwickelte Vorstellung eines Syndermoplasten als Weg mit gewissen Einschränkungen auch auf das Pilzmycel Anwendung finden kann. Entsprechende Vorgänge in der Peripherie der Zelle bewirken schließlich das Auftreten des Wassers, das bezeichnenderweise an den Hyphen-Spitzen bevorzugt, zum Teil sogar ausschließlich, eintritt. Möglicherweise sind dabei besonders auch jene Prozesse beteiligt, die das sogenannte „extra-Wasser“ (LUNDEGARDH 1957) hervorbringen. Gleichzeitig werden aber je nach Organismus und äußeren Umständen auch noch andere Stoffe freigesetzt. Während ein Teil der ausgeschiedenen Verbindungen wieder im Stoffwechsel verbraucht werden kann, bleibt das Wasser bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit außerhalb der Zelle liegen und wird sogar durch laufende Zufuhr aus dem Substrat vermehrt. Auf Grund dieser Voraussetzungen scheiden junge Hyphenspitzen mit intensivem Stoffwechsel rasch große Tropfen mit relativ wenig darin gelösten Stoffwechselprodukten aus, während ältere Hyphen wesentlich langsamer guttieren, die Tropfen jedoch um so mehr gelöste Substanzen enthalten. Durch diese Ergebnisse werden auch Autoren wie BULLER u. a. (LOHWAG 1941) bestätigt, die in der Guttation einen Exkretionsvorgang sahen. Ebenso trifft dies auf die Folgerungen zu, die KNOLL (1912) aus seinen eingehenden Untersuchungen an den Cystiden einiger Hymenomyceten zog.

Das Austreten von Wasser an einigen Nektarien beschrieb WILSON (1881) als rein osmotischen Vorgang. Einige der eigenen Befunde stützen diese Auffassung durchaus. Allerdings läßt sie sich nicht verallgemeinern. Vor allem entspricht sie nicht der Dynamik des Stoffwechsels, da Substanz- und Wasserausscheidung eng miteinander gekoppelt sind. Nur an totem oder älterem Mycel mit stark reduziertem Stoffwechsel ruft

bereits die hygroskopische Eigenschaft in und auf der Zellwand abgelagerter Substanzen eine Tropfenbildung hervor. An jungem, lebendem Mycel hingegen dürften grundsätzlich ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie sie BAUER (1951) bei submersen Pflanzen feststellte. Als Triebkraft des Wasseraustausches sieht er die Assimilation mit der Bildung osmotisch wirksamer Substanzen an. Durch Verbrauch dieses Materials kann das Wasser schließlich wieder abgegeben werden.

Die Rolle der Permeabilität bei der Guttation wurde schon früher erörtert (SPRECHER 1959 a), doch ist dabei zu beachten, daß die Permeabilität nicht nur von den Plasmahautschichten abhängig ist, konnte doch HÖFLER (1959) zeigen, daß der Wasseraustritt durch den Diffusionswiderstand des Binnenplasmas bestimmt wird.

Die Guttation der Pilze ist somit Ausdruck einer mangelhaften Korrelation zwischen eingeschränkter Abdunstungsmöglichkeit an den Luft-hyphen und uneingeschränkter Wasseraufnahme durch Zellen mit intensivem Stoffwechsel.

Diese Ansicht, die ähnlich von FREY-WYSSLING (1940) bereits für die Guttation an höheren Pflanzen vertreten wurde, erhält eine Stütze durch den Vergleich zwischen Tropfenausscheidung von Pilzen und von höheren Pflanzen am natürlichen Standort. Bei höheren Pflanzen löst reger Stoffwechsel der Wurzeln im wärmeren Boden und reduzierte Transpiration in kalten Nächten die Guttation aus (GÄUMANN 1938; FREY-WYSSLING 1940). Demgegenüber erscheinen die Tropfen auf Fruchtkörpern von *Polyporus*-Arten (WILSON 1948) am Morgen, also dann, wenn der Stoffwechsel des ungeschützten Fruchtkörpers infolge der Temperaturerhöhung wieder anläuft, die Luftfeuchtigkeit in Bodennähe aber noch relativ groß ist. Die ausgeschiedenen Tropfen werden über die Mittagszeit durch Verdunstung wieder reduziert und verschwinden gegen Abend unter Umständen völlig. Damit sind die Vorgänge, die zu einer Guttation führen, bei Pilzen und höheren Pflanzen trotz verschiedener Guttationszeiten und unterschiedlicher Organisation grundsätzlich dieselben. In beiden Fällen ist ein intensiver Stoffwechsel der Organismen die Voraussetzung und eine positive Wasserbilanz der auslösende Faktor.

STAHL (1920) vertrat die Ansicht, daß die Guttation der Entfernung von Ballaststoffen dient. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, daß besonders junge Hyphen auch primäre Bau- und Betriebsstoffe ausscheiden, die vom Pilz wieder verwertet werden können. Erst in Dauerkulturen reicherten sich, in Übereinstimmung mit den von RIPPEL und BEHR (1935) an *Aspergillus* gewonnenen Ergebnissen, schlecht oder überhaupt nicht verwertbare Verbindungen im Substrat an, was bei den drei untersuchten Pilzen jedoch erst deutlich wurde, wenn dasselbe Substrat sukzessive von mehreren Pilzgenerationen bewachsen oder ein älteres Impfstück untersucht wurde. FREY-WYSSLING (1935) modifizierte später

STAHL'S Ansicht, indem er der Guttation primär eine Rolle bei der Unterstützung des Diffusionsstroms von Zelle zu Zelle zuwies und ihr sekundär in der Ausscheidung von Ballastionen eine physiologische Bedeutung zusprach.

Inwieweit die Rekretion durch Guttation bei Pilzen wesentlich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, doch wäre dies aus den Vorgängen der Anionenausscheidung verständlich und würde sich ausgezeichnet in das hier entworfene Bild einfügen.

Zusammenfassung

An den beiden Ascomyceten *Endoconidiophora virescens* Davids. und *E. (Ceratocystis) coerulescens* (Münch) Bakshi, sowie an dem Basidiomyceten *Lentinus lepideus* L. wurden die Ausscheidungen von primären Stoffwechselprodukten und die Guttation untersucht. Im einzelnen ergaben sich folgende Befunde:

1. Der „pool“ der primären Stoffwechselprodukte erwies sich in qualitativer Hinsicht als sehr konstant, was auch weitgehend auf die Ausscheidung dieser Verbindungen zutrifft, die allerdings im Laufe des Wachstums eine typische qualitative und quantitative Veränderung erfährt. Unterschiedliche Kulturbedingungen kamen lediglich über eine Beschleunigung oder Verlangsamung des allgemeinen Entwicklungsablaufes zum Ausdruck. Sie ergaben vor allem quantitative Veränderungen.

2. Die Guttation wurde als Ergebnis mangelhafter Korrelation zwischen eingeschränkter Abdunstungsmöglichkeit der Lufthyphen und uneingeschränkter Wasseraufnahme durch die Zellen mit intensivem Stoffwechsel erkannt; es wurden Parallelen zu der Guttation an höheren Pflanzen gezogen.

3. Die Ergebnisse wurden mit den Befunden anderer Autoren verglichen und die gemeinsamen Grundlagen aller pflanzlichen Stoffausscheidungen diskutiert.

Literatur

- BAUER, L.: Protoplasma (Wien) **41**, 178 (1951).
BIEBL, R.: Protoplasma (Wien) **41**, 353 (1952).
BOGEN, H. J.: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II. Allgemeine Physiologie der Pflanzenzelle, S. 116—124. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956.
BOSE, S. K.: Science and Culture **21**, 168 (1955).
BREFELD, O.: Untersuchungen über Schimmelpilze, Heft IV. Leipzig 1881.
BUTTERFASS, TH.: Protoplasma (Wien) **47**, 398, 415 (1956).
CARTWRIGHT, K. ST. G., and W. P. K. FINDLAY: Decay of Timber and its Prevention. London 1946.
CAVALLINI, D., N. FRONTALI and G. TOSCHI: Nature (Lond.) **163**, 568 (1949).
COWIE, D. B., and F. T. McCLURE: Biochim. biophys. Acta **31**, 236 (1959).
COWIE, D. B., and B. P. WALTON: Biochim. biophys. Acta **21**, 211 (1956).
EBERHARDT, G.: J. Amer. chem. Soc. **78**, 2832 (1956).

- FOSTER, J. W.: *Chemical Activities of Fungi*. New York 1949.
- FREY-WYSSLING, A.: *Die Stoffausscheidungen der höheren Pflanzen*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1935.
- FREY-WYSSLING, A.: *Ber. schweiz. bot. Ges.* **51**, 321 (1941).
- FUERST, R., and R. P. WAGNER: *Arch. Biochem.* **70**, 311 (1927).
- GÄUMANN, E.: *Ber. dtsh. bot. Ges.* **56**, 396 (1938).
- GLADTKE, E., u. W. BRUCKER: *Arch. Mikrobiol.* **29**, 53 (1958).
- GALE, E. F.: *Synthesis and Organisation in the Bacterial Cell*. New York 1959.
- HEYL, J. G.: *Planta (Berl.)* **20**, 294 (1933).
- HÖFLER, K.: *Ber. dtsh. bot. Ges.* **65**, 391 (1953); **72**, 236 (1959).
- HÖHN, K., u. A. ELFERT: *Beitr. Biologie Pflanzen* **34**, 247 (1958).
- HÜLSBRUCH, M.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. III. Pflanze u. Wasser, S. 522—540. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956.
- JAHN, A.: zit. nach BURGEFF, H.: *Saprophytismus und Symbiose*. Jena 1932.
- JOHANNES, H.: *Flora (Jena)* **134**, 58 (1940).
- JONES, A. R., E. J. DOWLING and W. J. SKRABA: *Analyt. Chem.* **25**, 394 (1953).
- KATING, H.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 235 (1955a); **22**, 368 (1955b); **22**, 396 (1955c).
- KISSER, J. G.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie* Bd. X: *Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe*. S. 91—131. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1958.
- KNOLL, F.: *Jb. wiss. Bot.* **50**, 453 (1921).
- KNOLL, F.: *Ber. dtsh. bot. Ges.* **30**, 36 (1912).
- KRAMER, P. J.: *Plant and Soil Water Relationships*. London 1950.
- LANDOLT-BÖRNSTEIN: *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik*, Bd. III. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1953.
- LEPESCHKIN, W. W.: *Beih. bot. Zbl.* **19**, 409 (1906).
- LOHWAG, H.: *Anatomie der Asco- und Basidiomyceten*. Berlin: Bornträger 1941.
- LUNDEGARDH, H.: *Klima und Boden*. Jena: Fischer 1957.
- MANDELSTAM, J.: *Biochem. J.* **69**, 103 (1958).
- MEYERS, E., and S. G. KNIGHT: *Appl. Microbiol.* **6**, 174 (1958).
- MORTON, A. G., and D. BROADBENT: *J. gen. Microbiol.* **12**, 248 (1955).
- NETTER, H.: *Theoretische Biochemie*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959.
- PAECH, K.: *Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1950.
- PEENNIG, N.: *Arch. Mikrobiol.* **25**, 109 (1956).
- PIESCHEL, E.: *Bot. Arch.* **8**, 64 (1924).
- PILLAI, N. C., and K. S. SRINIVASAN: *J. gen. Microbiol.* **14**, 248 (1956).
- PLUNKETT, B. E.: *Ann. Bot.* **22**, 237 (1958).
- PRESCOTT, S. C., and C. G. DUNN: *Industrial Microbiology*. New York 1959.
- RACKER, E.: *Advanc. Enzymol.* **15**, 141 (1954).
- RIPPEL, A., u. G. BEHR: *Arch. Mikrobiol.* **6**, 359 (1935).
- RIPPEL, A., G. BEHR u. K. NABEL: *Arch. Mikrobiol.* **9**, 375 (1938).
- ROBERTS, O.: *Proc. of the 7th intern. bot. congress Stockholm 1950*, S. 453 (1953).
- ROBERTS, R. B., P. H. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOLTON and R. J. BRITTON: *Carnegie Institut of Washington publication Nr. 607* (1955).
- SCHMITZ, J.: *Über das Wachstum der Sphaeria carpophila Pers. Linnaea* **17** (1843); zit. nach LOHWAG, H. *Anatomie der Asco- und Basidiomyceten*. Berlin: Bornträger 1941.
- SCHÜTTE, K. H.: *The new Phytologist* **55**, 164 (1956).
- SCHWARTZ, W., u. G. KAESS: *Arch. Mikrobiol.* **5**, 157 (1933).

- SEYBOLD, A.: *Planta* (Berl.) **16**, 518 (1932).
- SIMONART, P., and K. Y. CHOW: *J. Microbiol. and Serol.* **19**, 245 (1953).
- SPRECHER, E.: *Planta* (Berl.) **53**, 565 (1959 a).
- SPRECHER, E.: *Naturwissenschaften* **46**, 671 (1959 b).
- SPRECHER, E.: Über die Stoffausscheidung bei Pilzen. Hab.-Arbeit, Karlsruhe 1960.
- STAHL, E.: *Flora* (Jena) **113**, 1 (1920).
- STOCKER, O.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. III, Pflanze und Wasser. S. 312—323. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956.
- STRUGGER, S.: *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1949.
- TANDON, S. P., K. BAHADUR u. J. S. CHAUHAN: *Zbl. Bakt., II. Abt.* **110**, 674 (1957).
- THORNTHWAITTE, C. W.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. III, Pflanze und Wasser. S. 257—264. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956.
- TOUZÉ-SOULET, J. M., et CH. MONTANT: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **152**, 874 (1958).
- TROSCHEIN, A. S.: *Das Problem der Zellpermeabilität*. Jena: Fischer 1958.
- URSPRUNG, A., u. G. BLUM: *Zbl. Bakt., II. Abt.* **64**, 445 (1925).
- WALTER, H.: *Die Hydratur der Pflanze*. Jena: Fischer 1931.
- WARTIOVAARA, V.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. II, *Allgem. Physiologie der Pflanzenzelle*, S. 369—380. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956.
- WEIGL, J.: Vorgetragen auf dem „Rhein-Main-Colloquium“ Frankfurt/Main 26. 2. 1960.
- WHITMORE, L. M., and W. H. PETERSON: *Arch. Biochem.* **69**, 210 (1957).
- WILSON, J. K.: *Mycologia* (N. Y.) **40**, 605 (1948).
- WILSON, W.: *Unters. Bot. Inst. Tübingen* **1**, 1 (1881).
- ZOFF, W.: *Die Pilze*. Breslau 1890.

From the Institute of Microbiology at the Royal Agricultural College of Sweden,
Uppsala, Sweden

Silage Studies X.

Studies on Fermentation Processes in Silage

Malt as a Supplement in Biological Ensiling

By

CONRAD RYDIN

(Eingegangen am 23. September 1960)

In the biological ensiling of clover and lucerne the limited supply of carbohydrates fermentable by lactic acid bacteria is often a factor that prevents a sufficient production of lactic acid. In order to obtain first-class silage from these types of forage, a lactic acid production of about 3% is required when ensilings are carried out at the high temperatures which often are common in practice. The influence of temperature on the process of ensiling has been studied by NILSSON, TOTH and RYDIN (1956).

In order to increase lactic acid fermentation the addition of ground cereal grains is recommended by several investigators. Silage of good quality has been produced when this supplement was used in relatively small amounts in experiments by NORDFELDT (1955) and SMYK (1957). On the other hand, in experiments carried out by the author with clover and lucerne with low sugar content, the admixture of up to 4 or 6% of cereal meal did not have any satisfactory effect on the course of fermentation (RYDIN 1957). The concentration of lactic acid was often low in silages with this supplement, while the amount of butyric acid, on the other hand, was high. In these experiments, therefore, it would seem that the lactic acid bacteria were unable to ferment the majority of the carbohydrates (starch) in the cereal meal. When wheat meal was added together with malt meal the fermentation process was affected favourably, even when relatively small amounts of the malt-wheat mixture were used. The good effect of malt on the fermentation process is a result of its content of enzymes, which catalyze the hydrolysis of raw starch in the meal mixture and of certain polysaccharides in the green forage into fermentable dextrins and sugars for lactic acid bacteria. The aim of the present investigation was to show in more detail the extent to which malt can be used as a supplement in silage-making to promote lactic acid fermentation.

Silage experiments were made to examine how malt meal affects the fermentation process when added to the green forage — partly alone,

partly mixed with finely-ground meal of different cereals. The effect of the addition of only small quantities of malt together with cereal meal was particularly examined, because for economic reasons primarily, the amount of malt ought to be limited.

Materials and methods

The silage experiments comprised 4 series in which green forage was used, the botanical and chemical composition of which is given in Table 1. The forage mixture in series I consisted of about 2/3 lucerne and 1/3 grass, the mixture in series II of

Table 1
The botanical and chemical composition of the ensiled material in the different series

Ensiled material		Dry matter %	Crude protein %	Crude fat %	Nitrogen free extract		Crude fibre %	Ash %
					Sugar %	Total %		
Series I	Lucerne-grass	19.3	3.18	0.79	1.40	8.57	4.66	2.10
		(100)	(16.48)	(4.09)	(7.25)	(44.40)	(24.15)	(10.88)
Series II	Clover-grass	20.5	3.29	0.72	1.95	9.15	3.11	4.23
		(100)	(16.05)	(3.51)	(9.51)	(44.63)	(15.17)	(20.63)
Series III	Lucerne-grass	22.9	4.00	0.76	2.73	10.95	3.77	3.42
		(100)	(17.47)	(3.32)	(11.92)	(47.82)	(16.46)	(14.93)
Series IV	Clover	14.2	2.88	0.61	0.48	5.80	2.89	2.02
		(100)	(20.28)	(4.30)	(3.38)	(40.85)	(20.35)	(14.23)

about half clover and half grass, the mixture in series III of about half lucerne and half grass, while series IV was pure clover. The crops in series I and II were rather difficult to ensile because of their low content of dry matter and sugar. The forage in series III was harvested after a long period of fine weather which favourably influenced the chemical composition of the fodder for silagemaking, because of its relatively high dry matter content and high sugar content. The clover crop in series IV was on the other hand very difficult to ensile because both its dry matter and sugar content were low. Furthermore the protein content in the dry matter was relatively high, which also makes the forage difficult to ensile. This crop was harvested during a period of rain.

All the crops were harvested at the pre-flowering stage and were ensiled after chopping. The ensilings were carried out under controlled and identical conditions in small experimental silos of stainless steel, each containing 12 kg forage (NILSSON et al. 1956). The ensilings were made in a constant-temperature chamber at 28°C.

The effluent was tapped daily or every second day from the silos during the whole fermentation process.

In the various experiments the effect was examined of the admixture of different quantities of malt meals with varying amylolytic enzyme activities, of meal from different types of cereal, alone or mixed with malt meal in varying proportions and quantities. The different types and quantities of the supplements used are given in the Tables, which also show the duration of the ensiling process in the different series.

The effect of the different supplements on fermentation was determined by chemical analyses of the silage at the end of the process. These analyses and the analyses of green fodder and supplements used were performed according to methods described in an earlier publication (RYDIN 1957).

Determinations were made on the dextrinizing power of extracts of malt and cereal meals. These determinations were made by a somewhat modified method of SANDSTEDT, KNEEN and BLISH (SANDSTEDT et al. 1939; KNEEN et al. 1941). In these determinations a suitable quantity of enzyme was allowed to act on a starch substrate, and the time required for decomposition of the starch into dextrins of relatively low molecular weight was measured. In the enzymatic hydrolysis of starch, such dextrins are rapidly formed by the activity of α -amylase. As β -amylase, however, greatly accelerates the dextrinogenic activity of α -amylase, a combined effect of both α - and β -amylase activities is accounted for in these determinations. The figures attained in measuring the dextrinizing power by the method used, indicates the number of grams of starch which is dextrinized by 100 grams of the enzyme sample in 15 minutes at 30°C with a pH-value of 5.0 in the solution. In

Table 2. *Silage classification scheme*

Ammonia-nitrogen of total nitrogen %	Butyric acid of lactic- + but. acid %	Quality
< 10,0	< 5,0	Excellent
10,1—12,5	5,1—12,5	Very good
12,6—15,0	12,6—25,0	Good
15,1—17,5	25,1—37,5	Satisfactory
17,6—20,0	37,6—50,0	Bad
> 20,1	> 50,1	Miserable

measuring the saccharifying power of different cereal meals, which is due to the activity of mainly β -amylase, a method was used described by SANDEGREN et al. (1950).

In determining the quality of the silage the percentage of ammonia-nitrogen of total nitrogen and the percentage of butyric acid of lactic acid + butyric acid in the silage are both good indicators. The table for estimating silage quality given in an earlier publication (NILSSON et al. 1956) to the values of the percentage of $\text{NH}_3\text{-N}$ of total N and the amount of butyric acid would seem to have been unnecessarily rigid, so far as the presence of butyric acid is concerned. As this work discusses silages of different qualities, these have been assessed according to a rather more tolerant scale given in Table 2, which allows larger contents of butyric acid in the silage when the lactic acid contents also show high values. The two indicators are not always parallel. In estimating the quality, the relatively higher value, whether of the percentage of $\text{NH}_3\text{-N}$ of total N or of the percentage of butyric acid of lactic acid + butyric acid is regarded as decisive.

Results and discussion

The effect of different malt meals, potato flour and barley meal on the fermentation process

In silage series I it was examined how the course of fermentation was influenced by the admixture of three malt meals, the dextrinogenic enzyme activities of which were different, and potato flour and barley meal with no or very small dextrinogenic enzyme activities (Table 3). This table also shows dry matter and sugar contents in the meals used. Malt meal I consisted of high dried malt of 2-row barley (brewer's malt) while malt meal II and III were low dried malt of 6-row barley (ensiling malt). The quantities of the various supplements used in the silages and

their influence on the silage quality is seen in Table 4. The time of ensiling was 8 weeks.

The analyses in Table 4 show that the qualities of the silages on the whole were better the greater quantities of malt meal used. It is also seen that the malt meal with the highest dextrinizing power gave better result than the malt meal with the lowest dextrinizing power.

The very good effect of the greater amounts of malt meals was a result partly of their high content of sugar, which in contrast to raw starch can be fermented by lactic acid bacteria in the silage. The main reason for the good effect seems to be, however, their content of enzymes

Table 3
Dry matter, sugar content and dextrinizing power in the supplements used in series I

Material	Dry matter %	Sugar %	Dextrinizing power
Malt meal I (2-row barley)	96.3	5.84	315
Malt meal II (6-row barley)	90.7	7.24	840
Malt meal III (6-row barley)	94.7	9.13	950
Potato flour	84.1	trace	0
Barley meal	86.2	1.29	trace

with amylolytic activities, which in the silage hydrolysed the starch in the malt meals so that it could be fermented by lactic acid bacteria. During the malting process the starch granules in the endosperm cells of the barley had been highly corroded by malt enzymes and so became more susceptible to amylases in the silages with malt.

The better silage quality which resulted when "ensiling malt" was used compared to "brewer's malt" was due to the higher dextrinizing power of the former. The starch was more completely hydrolysed to dextrins and sugars in the malt meal with the highest amylolytic activity. A high amylase activity in malt is, however, generally correlated with high cytolytic activity (BASS et al. 1957) so that the polysaccharides in the forage had probably been hydrolysed to sugar to a greater degree when "ensiling malt" was used.

The silages with potato flour or barley meal were all of very poor qualities. The sugar content in the green forage was not high enough for sufficient lactic acid production, and enzymes from the forage itself, from supplements or from their microflora could not hydrolyse the polysaccharides in the forage or the supplements to give sufficient sugar production.

*The effect of different malt meals, alone
or mixed with cereal meal, on the fermentation process*

The aim of silage series II was to discover the effect on the fermentation process when meal of "brewer's malt" or "ensiling malt" was mixed

Table 4. *The effect of different malt meals, potato flour and barley meal on the fermentation process*
Analyses of silage after 8 weeks, Series I

Supplements		pH	Dry matter %	Sugar %	NH ₃ -N %	Tot. N %	NH ₃ -N of tot. N %	Lactic acid %	Acetic acid %	Butyr. acid %	But. ac. of L+B %
Malt meal I (2-row barley)	0.75%	5.5	15.9	0.07	0.152	0.484	31.4	0.4	0.70	1.55	79.5
	1.50%	4.9	17.0	0.12	0.069	0.507	13.6	1.5	0.42	0.78	34.2
	2.25%	4.6	18.2	0.16	0.076	0.500	15.2	2.0	0.46	0.64	24.2
	3.00%	4.2	18.4	0.25	0.049	0.488	10.0	2.4	0.32	0.44	15.5
	4.50%	4.1	19.4	0.14	0.044	0.526	8.4	3.3	0.50	0.03	0.9
Malt meal II (6-row barley)	0.75%	5.6	15.7	0.06	0.124	0.487	25.5	0.7	0.54	1.19	63.0
	1.50%	4.9	16.8	0.12	0.071	0.489	14.5	1.3	0.38	0.90	40.9
	2.25%	4.0	18.2	0.19	0.042	0.481	8.7	3.0	0.47	0.08	2.6
	3.00%	4.3	18.2	0.15	0.053	0.484	11.0	2.3	0.41	0.44	16.1
	4.50%	4.0	18.7	0.24	0.043	0.529	8.1	3.4	0.59	0.03	0.9
Malt meal III (6-row barley)	0.75%	5.0	16.5	0.11	0.092	0.490	18.8	1.3	0.61	0.70	35.0
	1.50%	4.1	17.6	0.13	0.041	0.488	8.4	2.6	0.50	0.12	4.4
	2.25%	4.3	17.8	0.10	0.043	0.492	8.7	2.4	0.48	0.36	13.0
	3.00%	4.2	18.3	0.15	0.041	0.508	8.1	2.7	0.58	0.11	3.9
	4.50%	4.0	18.2	0.17	0.041	0.518	7.9	3.0	0.70	0.02	0.7
Potato flour	3.00%	5.6	18.4	0.12	0.156	0.465	33.5	0.3	0.80	1.37	82.0
	4.50%	5.5	17.6	0.22	0.139	0.449	31.0	0.3	0.77	1.38	82.1
Barley meal	3.00%	5.6	16.4	0.07	0.155	0.490	31.6	0.3	0.69	1.50	83.3
	4.50%	5.5	16.8	0.06	0.140	0.529	26.5	0.5	0.67	1.38	73.4

in the forage, alone or together with smaller or greater amounts of oats-barley meal. The differences in dry matter, sugar content and dextrinizing power between the supplements used are shown in Table 5. The amounts of meal used and the effect of these on the course of fermentation are shown in Table 6. The time of ensiling was 24 weeks.

The addition of malt meal alone in amounts of 1–3% had a favourable effect on the fermentation process and had a better effect on fermentation than corresponding amounts of cereal meal. The positive effect of the malt meals seems to have been due primarily to their

Table 5
Dry matter, sugar content and dextrinizing power in the supplements used in series II

Material	Dry matter %	Sugar %	Dextrinizing power
Malt meal (2-row barley)	93.8	5.89	375
Malt meal (6-row barley)	93.1	9.70	1030
Oats-barley mixture	91.5	1.46	trace

dextrinogenic enzyme activities by which the starch in the malt meals were hydrolysed to a large extent to fermentable sugar by lactic acid bacteria in contrast to the starch in the cereal meal mixture with its low dextrinogenic power. It is difficult to explain why the use of only 1% of either of the two malt meals gave better silage qualities than when 2 or 3% was used. In earlier ensiling experiments (RYDIN 1957) and in the other series in this work, silage qualities have mostly been better the larger the malt quantities used. The explanation may possibly be, that during the long ensiling period of this series, putrefactive products from the outer layers of the silage more easily penetrated into the forage with the larger amounts of malt, because the large quantity of malt enzymes reduced the viscosity of the liquid in the silage. A result of the reduction in viscosity there may have been an increase in the loss of effluent, and therefore, of sugar and lactic acid, so resulting in a deterioration in silage quality. During the whole ensiling period effluent was tapped from the silos, but the amounts were not measured.

The addition of cereal meal alone in larger doses had a positive effect on the fermentation process. The reason for this may be that the amount of effluent and therefore the loss of sugar and lactic acid was not so copious in these silages, because the dry matter content of the silage was increased by the admixture of large amounts of cereal meal. The favourable effect must, however, partly be ascribed to the sugar in the cereal meal, which can be used for lactic acid production. Possibly a certain proportion of the starch in the cereal meal could have been used for lactic acid fermentation after hydrolysis to sugar by amylase in the cereal or green forage—principally β -amylase—since a fraction of the

starch in cereal meal can in fact be attacked by this enzyme (cp series III in this work). The starch hydrolysis would seem to have been incomplete, so that the necessary amounts of lactic acid could not always have been formed. Despite the admixture of large amounts of cereal meal the butyric acid fermentation was quite considerable.

When small amounts of meal of enzyme-rich "ensiling malt", 0,5 to 1,0% were added to the forage together with varying amounts of oats-barley meal the silage qualities were always very good. The same good result was not obtained with the "brewer's malt". The high amylolytic activity of the "ensiling malt" would seem to be the principal explanation for the good ensiling effect of the meal mixture, the enzyme activity of the malt being sufficient to hydrolyse a large proportion of the starch in both malt meal and cereal meal.

The effect of malt meal, alone or mixed with different cereal meals, on the fermentation process

The aim of series III was to find out the effect on the fermentation process of small quantities of "ensiling malt" mixed with wheat, rye, barley or oats. The dry-matter, sugar contents and the dextrinizing power in the various meal types used are shown in Table 7.

Table 7

Dry matter, sugar content and dextrinizing power in the supplements used in series III

Material	Dry matter %	Sugar %	Dextrinizing power
Malt meal (6-row barley)	93.9	9.10	975
Wheat meal	90,0	1,19	trace
Rye meal	90,0	0,65	trace
Barley meal	89,7	1,06	trace
Oats meal	91,7	0,97	trace

Table 8. *Dextrinizing power in the meal mixtures used in series III*

Material	Dextrinizing power			
	Wheat	Rye	Barley	Oats
1 part malt + 1 part cereals	715	660	650	555
1 part malt + 2 parts cereals	570	535	445	385
1 part malt + 3 parts cereals	515	420	355	355
1 part malt + 5 parts cereals	445	350	280	270
1 part malt + 8 parts cereals	240	200	160	115

The dextrinizing power of various mixtures of malt meal and meals of the different cereals are shown in Table 8. It can be seen that a remarkably higher dextrinizing power was found in the meal mixtures than might be expected. In the mixture ratio 1 : 2, 570 units were obtained, when wheat was included in the mixture, while 325 units could be

expected, i.e. $\frac{1}{3}$ of the malt's dextrinizing power, as the dextrinizing power of wheat was insignificant. The different types of grain used, especially wheat, rye and barley contain active β -amylase in considerable quantities, while α -amylase is formed or set free from an inactive complex only during germination (KERR 1950, MYRBÄCK et al. 1950). Determinations were made of the saccharifying power, a result mainly of the activity of β -amylase in the different cereal meals used (Table 9). Wheat showed the highest activity of free or free + bound β -amylase followed by rye, barley and oats. The differences in the dextrinizing power of the

Table 9. *Saccharifying power of the cereal meals used in series III*

Material	Saccharifying power		
	Free	Bound	Free + bound
Wheat	436	256	692
Rye	215	69	284
Barley	147	91	238
Oats	10	1	11

mixtures of malt meal and cereal meal of different types (Table 8), can therefore primarily be ascribed to the variations in the activities of free β -amylase in the different cereals, as the dextrinization is a result of a combined activity of α - and β -amylase. Probably also the bound β -amylase of the cereals had some effect after activation by malt enzymes.

Table 10 shows the meals and meal mixtures used in the ensiling series and the effect of the different supplements on the fermentation process. As the forage kept a high sugar content and therefore was easy to ensile the effect of the different supplements used was not so obvious, but certain interesting observations can be made.

That the addition of malt meal in amounts of 2.4 or 3.6% had a favourable influence on the fermentation process is shown by the fact that the percentage ammonia N/total N and the percentage butyric acid/lactic + butyric acid were lower in these silages than in the control without supplement. The four cereal meals showed no good effect despite the fact that the quantities of meal added amounted to as much as 4.8%. The addition of 4.8% of malt and cereal meal in the ratio 1 : 5 resulted, on the other hand, in silages with larger lactic acid quantities and therefore lower figures for the two quality-factors than in the silages where 4.8% cereal meal alone was added. The silages with an addition of 3.6% of malt-cereal mixtures 1 : 8, 1 : 5 and 1 : 3 were all of first class quality. The greater the quantity of malt included in the meal mixtures, the higher the content of lactic acid found in the silage.

The very good effect of malt or malt-cereal mixtures must be ascribed to their high amylolytic activities by which the raw starch in the meals

Table 10. *The effect of malt meal and different cereal meals, alone or in mixtures on the fermentation process*
Analyses of silage after 18 weeks. Series III

Supplements	pH	Dry matter %	Sugar %	NH ₃ -N %	Tot. N %	NH ₃ -N of tot. N %	Lactic acid %	Acetic acid %	Butyr. acid %	But. ac. of L+B %
Control	4.2	18.4	0.30	0.056	0.569	9.8	3.1	0.56	0.25	7.5
Malt meal (6-row barley) 2.4%	4.1	19.7	0.50	0.053	0.605	8.8	3.5	1.02	0.07	2.0
3.6%	3.9	20.8	1.64	0.047	0.645	7.3	3.6	0.70	0.03	0.8
Wheat meal 4.8%	4.2	21.8	0.31	0.077	0.668	11.5	3.1	0.62	0.33	9.6
Rye meal 4.8%	4.1	21.4	0.48	0.075	0.661	11.3	3.5	0.52	0.41	10.5
Barley meal 4.8%	4.2	22.0	0.44	0.074	0.643	11.5	3.0	0.56	0.58	16.2
Oats meal 4.8%	4.3	21.5	0.30	0.077	0.654	11.8	3.0	0.60	0.54	15.3
Malt meal 0.4% + wheat meal 3.2%	4.0	20.6	0.46	0.060	0.637	9.4	3.6	0.88	0.09	2.4
0.4% + rye meal 3.2%	4.0	20.3	0.52	0.056	0.614	9.1	3.3	1.05	0.02	0.6
0.4% + barley meal 3.2%	4.1	20.7	0.38	0.057	0.631	9.0	3.3	0.91	0.09	2.7
0.4% + oats meal 3.2%	4.1	20.7	0.44	0.059	0.636	9.3	3.3	1.01	0.08	2.4
Malt meal 0.6% + wheat meal 3.0%	4.0	20.6	0.48	0.060	0.645	9.3	3.7	0.86	0.06	1.6
0.6% + rye meal 3.0%	4.0	21.1	0.52	0.057	0.638	8.9	3.7	0.89	0.07	1.9
0.6% + barley meal 3.0%	4.0	20.7	0.52	0.056	0.631	8.9	3.7	0.80	0.06	1.6
0.6% + oats meal 3.0%	4.1	21.2	0.39	0.057	0.632	9.0	3.5	0.90	0.06	1.7
Malt meal 0.9% + wheat meal 2.7%	3.9	20.7	0.74	0.059	0.645	9.1	4.2	0.69	0.03	0.7
0.9% + rye meal 2.7%	4.0	20.4	0.63	0.054	0.621	8.7	4.0	0.83	0.02	0.5
0.9% + barley meal 2.7%	3.9	20.8	0.72	0.056	0.616	9.1	4.1	0.70	0.02	0.5
0.9% + oats meal 2.7%	4.1	19.5	0.46	0.052	0.591	8.8	3.6	1.00	0.05	1.4
Malt meal 0.8% + wheat meal 4.0%	4.0	20.8	0.54	0.061	0.655	9.3	4.1	0.83	0.04	1.0
0.8% + rye meal 4.0%	3.9	22.2	0.63	0.055	0.651	8.4	4.2	0.86	0.02	0.5
0.8% + barley meal 4.0%	4.0	21.2	0.52	0.056	0.647	8.7	4.1	0.94	0.03	0.7
0.8% + oats meal 4.0%	4.0	21.0	0.50	0.055	0.646	8.5	4.4	1.07	0.02	0.5

was to a high degree broken down to fermentable sugars for lactic acid bacteria. KNEEN et al. (1941) have shown that the activity of malt in hydrolysing raw wheat starch is highly correlated to its α -dextrinogenic activity and that α -amylase is solely responsible for the erosion of the outer or surface layer of the starch granule, which is much more resistant to amylases than the starch within. Thus intact starch granule cannot be attacked by β -amylase. Cereal meals, however, contain small amounts of starch available for β -amylase. "This available portion supposedly consists partly of ruptured or broken starch granules, and partly of starch that, due to structural peculiarities, is less resistant to amylases than the main portion of the starch in cereal meals" (SANDSTEDT et al. 1937).

Table 11. *Dextrinizing power of malt-wheat meal mixture extracted with distilled water and macerates of clover of different concentrations*

Material	Extraction medium	Dextrinizing power
Malt-wheat mixture	distilled water	500
Malt-wheat mixture	10% macerates	800
Malt-wheat mixture	20% macerates	850
Malt-wheat mixture	40% macerates	925
Malt-wheat mixture	100% macerates	925

STAMBERG and BAILY (1939) have also shown that raw wheat starch, which had been very finely pulverized by grinding for 84 hours in a rod mill, could easily be hydrolysed by both α - and β -amylase. In silages with malt meal or malt + cereal meals the starch granules have first been attacked by α -amylase. By the activity of α -amylase new points of attack for β -amylase were produced. The decomposition of the starch was thus a result of the combined activities of both α - and β -amylase. As there were only traces of α -amylase activity in the cereal meals and as β -amylase found there can only insignificantly attack raw starch in the meals, the starch in the silages with only cereal meal did not hydrolyse to any notably extent. Therefore the greater part of the starch in these meals could not be used for lactic acid fermentation.

Experiments to prove dextrinizing power in macerates of clover have been made by the author, but it has not been possible to show its existence in any quantities worth mentioning. It has, on the other hand, been shown that macerates from the plant material increase the dextrinizing power of a malt-cereal mixture. A mixture of 1 part malt and 2 parts wheat meal was extracted partly with distilled water and partly with macerates of clover in varying concentrations, after which the dextrinizing power in these solutions was measured. Table 11 shows the results of these measurements. From the Table it is seen that the dextrinizing power was considerably greater when up to 40% macerates was included in the

extraction medium, but further increase in activity did not take place when the extraction medium consisted of macerates alone. Enzymes from the plant material, probably β -amylase, would seem therefore to have contributed in increasing the dextrinizing power of the malt-cereal meal mixture, when the amount of macerates increased up to a certain amount, beyond which no further effect could be observed. SANDSTEDT et al. (1939) have shown that the addition of small amounts of β -amylase to starch with α -amylase, greatly increased the dextrinogenic activity and that the greatest activity occurred at a certain mixture ratio between the two amylases. According to BAILY (1958) the cytoplasm in clover has a high content of β -amylase.

No greater difference in the quality of silage was obtained in experiment series III as a result of the addition of various types of cereal meal mixed with malt meal. It was perhaps to be expected that for example the addition of mixtures of malt and wheat meal with higher dextrinizing power than the corresponding mixtures of malt and oat meal would have resulted in better silage qualities than when the latter meal mixtures were used. The reason why this was not so must be that the dextrinizing power in the different malt-cereal mixtures in the silage attained sufficiently high values for a strong hydrolysis of starch because of the surplus of β -amylase in the plant material.

The effect of different wheat meals, alone or mixed with malt meal, on the fermentation process

The results of series II and III have shown that the starch in cereal meal can be made largely available to the lactic acid bacteria in silage by the addition of quite small quantities of malt. The experiment in

Table 12
Dry matter, sugar content and dextrinizing power in the supplements used in series IV

Material	Dry matter %	Sugar %	Dextrinizing power
Malt meal (6-row barley)	90,7	7,24	840
Wheat meal	87,5	1,56	30
Wheat flour I	87,7	1,10	15
Wheat flour II	87,2	0,97	trace

series IV was performed in order to examine whether it is possible to use cereal meal with obvious dextrinizing power as a supplement in relatively small amounts without at the same time adding malt. The effect of the admixture of small amounts of enzyme-rich malt meal in the cereal meals used was also investigated.

In the experiment, meal of two different types of wheat was added to the green forage. One of these had a relatively high dextrinizing power as

Table 13. *The effect of malt meal and different wheat meals, alone or in mixtures, on the fermentation process*
Analyses of silage after 6 weeks. Series IV

	Supplements	pH	Dry matter %	Sugar %	NH ₃ -N %	Tot. N %	NH ₃ -N of tot. N %	Lactic acid %	Acetic acid %	Butyr. acid %	But. ac. of L+B %
Malt meal (6-row barley)	1.2%	5.3	11.3	0.04	0.124	0.475	26.1	0.2	0.95	1.20	85.7
	2.4%	4.4	12.9	0.12	0.053	0.472	11.2	1.9	0.60	0.53	21.8
	3.6%	3.8	15.4	0.16	0.049	0.496	9.9	3.2	0.43	0.01	0.3
Wheat meal	2.4%	5.0	12.5	0.05	0.089	0.498	17.9	0.2	0.98	1.11	84.7
	2.4%	5.1	12.1	0.06	0.108	0.477	22.6	0.3	1.05	1.13	79.0
	2.4%	5.1	11.8	0.06	0.098	0.471	20.8	0.3	1.00	1.02	77.3
Wheat meal	3.6%	4.8	14.9	0.05	0.072	0.512	14.1	1.2	0.59	0.58	32.6
	3.6%	4.4	15.5	0.07	0.063	0.500	12.6	1.8	0.55	0.40	18.2
	3.6%	5.1	13.5	0.04	0.119	0.513	23.2	0.3	1.12	0.99	76.7
Malt meal 0.4% + wheat meal	3.2%	4.0	15.2	0.16	0.054	0.506	10.7	2.9	0.45	0.05	1.7
	0.4% + wheat flour I	4.1	16.7	0.13	0.059	0.526	11.2	2.4	0.49	0.25	9.4
	0.4% + wheat flour II	4.7	13.4	0.05	0.067	0.490	13.7	1.3	0.60	0.69	34.7
Malt meal 0.6% + wheat meal	3.0%	4.0	15.5	0.20	0.052	0.497	10.5	2.8	0.51	0.02	0.7
	0.6% + wheat flour I	3.9	14.9	0.13	0.054	0.488	11.1	2.9	0.49	0.05	1.7
	0.6% + wheat flour II	4.0	15.0	0.11	0.054	0.490	11.0	2.7	0.49	0.05	1.8
Malt meal 0.9% + wheat meal	2.7%	4.3	14.4	0.11	0.054	0.478	11.3	2.2	0.60	0.15	6.4
	0.9% + wheat flour I	4.1	14.2	0.15	0.056	0.483	11.6	2.7	0.53	0.18	6.3
	0.9% + wheat flour II	3.9	15.7	0.30	0.051	0.530	9.6	3.1	0.47	0.01	0.3
Malt meal 1.2% + wheat meal	2.4%	4.1	14.8	0.21	0.053	0.492	10.8	2.8	0.53	0.20	6.7
	1.2% + wheat flour I	4.0	14.7	0.11	0.065	0.480	13.5	2.8	0.53	0.04	1.4
	1.2% + wheat flour II	3.9	14.6	0.29	0.056	0.470	11.9	3.0	0.49	0.01	0.3

it contained a large percentage of sprout damaged grains, while the other consisted of sound wheat grain, harvested during dry weather conditions. Of the first type of wheat the meal used was partly of whole grain and partly of grain from which the bran had been removed—wheat flour I. Of the second type of wheat only meal without bran was used—wheat flour II. The dry matter and sugar contents of the different meals are shown in Table 12, as well as their dextrinizing power. The meals were mixed with the green forage partly alone in quantities of 2.4 and 3.6% and partly together with malt meal at different mixture ratios and at a total quantity of 3.6% (Table 13).

The analyses of the fully fermented silages given in Table 13, show that the quality was very poor when 2.4% of the various wheat meals were used, and that with unsprouted wheat flour II silage quality was poor, even when the largest quantity, 3.6%, was added. An obviously better silage was obtained when the more enzyme-rich, sprout-damaged wheat meals were used in the largest quantity. This shows that even a rather weak dextrinizing power of the meals had a clearly positive effect. However, the dextrinizing power was too weak in all the wheat meals to ensure that the starch could be decomposed and made accessible to the lactic acid bacteria to such an extent that the silage produced was of first class quality. When mixtures of malt and wheat meals were used, the silage quality was clearly better. A mixture ratio of 1 part malt to 5 parts wheat meal gave on average quite as good a preserving effect as mixtures with a higher percentage of malt. Mixtures of 1 part malt meal and 8 parts of the different wheat meals gave good results only when sprout damaged wheat meals were used.

Zusammenfassung

Die Beimischung von mäßigen Mengen von Mehl verschiedener Getreidearten in Silage fördert die Milchsäuregärung nicht in nennenswertem Grad, da rohe Stärke nur in unbedeutendem Umfang von den Amylasen (hauptsächlich β -Amylasen) des Getreidemehls oder des Grünfutters in für Milchsäurebakterien vergärbaren Zucker hydrolysiert werden kann. Durch α -Amylase, welches Enzym in Malz in großen Mengen vorkommt, wird dagegen die rohe Stärke derart angegriffen, daß dadurch in der Silage ein fortgesetzter Abbau zu Milchsäure durch die sich dort befindenden Milchsäurebakterien erfolgt.

Durch Beimischung verhältnismäßig geringer Mengen enzymreichen Malzmehles ist es demnach unter praktischen Bedingungen möglich, einen großen Teil der Stärke, welche dem Futter mit den verschiedenen Getreidemehlen zugeführt wurde, den Milchsäurebakterien zugänglich zu machen. Die starke amyolytische Enzymaktivität bei Mischungen von Malz- und Getreidemehl ist ein additiver Effekt von der α -Amylase

des Malzes und der β -Amylase des Malzes, des Getreides und des Grünfutters.

This investigation was financially supported by „Fonden för främjande av Forsknings- och försöksverksamheten på jordbrukets område“, „Jordbrukets forskningsråd“, „Magn. Bergvalls Stiftelse“ and „Statens tekniska forskningsråd“. The author expresses his gratitude to Dr. G. KÖHLER, Head of the Analytical Laboratory, where the chemical analyses on forage and silage samples were carried out. The author also gratefully acknowledges the encouraging interest and support of Professor RAGNAR NILSSON.

Literature

- BAILEY, R. W.: *J. Sci. Food Agric.* **9**, 11, 748 (1958).
BASS, F. J., V. M. BENDELOW and W. O. S. MEREDITH: *Cereal Chem.* **34**, 4, 219 (1957).
KERR, R. W.: *Chemistry and industry of starch*. 1950.
KNEEN, E., and R. M. SANDSTEDT: *Cereal Chem.* **18**, 237 (1941).
KNEEN, E., O. C. BECKORD and R. M. SANDSTEDT: *Cereal Chem.* **18**, 741 (1941).
MYRBÄCK, K., and G. NEUMÜLLER: *Enzymes* **1**, 1, 653 (1950).
NILSSON, R., L. TÓTH and C. RYDIN: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 366 (1956).
NORDFELDT, S.: *Ensileringsförsök. Statens Husdjursförsök, Meddelande*, nr. 58 (1955).
RYDIN, C.: *Arch. Mikrobiol.* **27**, 82 (1957).
SANDEGREN, E., and L. ENEBO: *J. Inst. Brewing* **58**, 3, 198 (1952).
SANDSTEDT, R. M., M. J. BLISH, D. K. MECHAM and C. E. BODE: *Cereal Chem.* **14**, 17 (1937).
SANDSTEDT, R. M., E. KNEEN and M. J. BLISH: *Cereal Chem.* **16**, 712 (1939).
SANDSTEDT, R. M., E. KNEEN and M. J. BLISH: *Cereal Chem.* **18**, 237 (1941).
SMYK, B.: *Rozniki Nauk Rolniczyck* **71**, 313 (1957).
STAMBERG, O. E., and C. H. BAILY: *Cereal Chem.* **16**, 319 (1939).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt am Main

Analyse des Lysogenisierungsvorganges im System *Salmonella typhimurium*-Phage P 22 mit Hilfe von UV-Bestrahlung*

Von

HERMANN H. PRELL

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Oktober 1960)

Über die zur Lysogenisierung führenden Prozesse und die an ihnen beteiligten Funktionseinheiten von Phage und Bakterium ist in den letzten Jahren viel experimentelles Material gesammelt worden. Die zahlreichen Befunde lassen jedoch noch kein hinreichend klares Bild des gesamten Reaktionsablaufes erkennen. Immerhin bestehen gewisse Vorstellungen über die genischen Bedingungen des Lysogenisierungsvorganges, soweit sie durch das Phagengenom bestimmt werden (KAISER 1957; LEVINE 1957), über den Einfluß physiologischer Faktoren (LIEB 1953; BERTANI u. NICE 1954; LWOFF, KAPLAN u. RITZ 1954; BERTANI 1957; FRY 1959), den Einfluß der Inaktivierung durch UV- und Röntgenbestrahlung sowie P^{32} -Zerfall (LWOFF et al. 1954; GAREN u. ZINDER 1955; STENT u. FURST 1956; FRY 1959; KELLENBERGER, ARBER u. KELLENBERGER 1959) und den Einfluß der Multiplizität der Infektion (PRELL u. PRELL 1959). Indessen fehlt noch ein klares Bild über das physiologische Verhalten und die strahlenbiologischen Eigenschaften derjenigen Funktionseinheiten des infizierenden Phagen, die jeweils die lytische oder die lysogene Phagenentwicklung steuern. So wiesen GAREN et al. (1955) zwar nach, daß UV-Schäden im P 22 teilweise durch den Bakterienwirt reaktiviert werden können, jedoch blieb der weitere Befund unerklärt, warum die lytische und die lysogene Reaktionsmöglichkeit der Phagen bei UV-Bestrahlung jeweils mit verschiedener Kinetik inaktiviert werden. PRELL (1960) konnte indessen zeigen, daß sowohl lytisches als auch lysogenes Infektionsvermögen nach UV-Inaktivierung mehrfachreaktivierbar sind; die DNS des P 22 ist also bei der Veranlassung lytischer oder lysogener Phagenentwicklung in gleicher Weise rekombinierbar wie die DNS der virulenten T-Phagen. — Bei dieser Sachlage schien es aussichtsreich,

* Ein Teil der Versuchsergebnisse wurde bereits in einer Habilitationsschrift an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main niedergelegt.

mit Hilfe der UV-Bestrahlung freier P 22-Phagen und sorgfältiger Analyse der Inaktivierungskinetik neue Einblicke in die am Lysogenisierungsprozeß beteiligten Strukturen von Phage und Bakterium zu gewinnen und diese mit den bereits bekannten Tatsachen der Physiologie der Phagenentwicklung zu verknüpfen.

Material und Methodik

a) *Bakterien*. Alle Lysogenisierungsversuche wurden an einer tryptophanbedürftigen Mutante *Try*8⁻ von *Salmonella typhimurium* LT₂ unternommen. Nach 16stündiger Übernachtskultur in Bouillon bei 37°C und starker Durchlüftung wurden die Zellen geerntet, in P-Puffer gewaschen und, falls nicht besonders erwähnt, in einer Dichte von $1,2 \cdot 10^9$ Zellen/ml in P-Puffer suspendiert und bis zu Versuchsbeginn im Eisbad gehalten.

b) *Phagen*. P 22, Wildtyp (Trübplaque) H 1, wurde angereichert auf *Salmonella typhimurium* LT 2 (Wildtyp). Das Lysat enthielt nach Waschen und Suspendieren in P-Puffer sowie steriler Filtration $5 \cdot 10^{10}$ Plaquebildner/ml („Weichagartiter“, PRELL et al. 1959).

c) *Lysogenisierungsversuch*. 0,2 ml 3 min bei 37°C oder 25,5°C vorgewärmter Bakteriensuspension wurden mit 0,2 ml einer in P-Puffer verdünnten Phagensuspension versetzt. Zur Vermeidung von Mehrfachinfektionen — auch mit uv-inaktivierten Phagen — wurde die Multiplizität der Infektion, d.h. das Verhältnis aktiver bzw. inaktiver Phagen je Bakterium, gleich 0,01 gewählt. Nach 10 min Adsorptionszeit bei 37°C oder 25,5°C (mindestens 95% der Phagen adsorbiert) wurde die Mischung in Anti-P 22-Serum mit Bouillon verdünnt (4 bzw. 5 min bei 37°C bzw. 25,5°C belassen; 10^{-3} bzw. 10^{-2} überlebende freie Phagen), dann weiter verdünnt und in 2 ml Weichagar mit *Tgal*⁻ als Indikator auf Bouillonagarplatten mit Galaktosezusatz ausgegossen. Die Zahl der Infektionen je Platte betrug zwischen 50 und 100; 4—6 Parallelplatten wurden angelegt. Ein lytisch infiziertes Bakterium bildete nach etwa 6 Std einen trüben Plaque, während die überlebenden, galaktosevergärenden *Try*8⁻-Zellen nach 36 Std in einem dichten Hintergrund der im Wachstum benachteiligten *Tgal*⁻-Zellen (unfähig zur Galaktosevergärung) als gut erkennbare Papillen erschienen. Die lysogenen unter ihnen waren von den alysogenen durch einen deutlichen Lysishof unterschieden. Um mit Sicherheit von allen lysogenen Kolonien Phagenproduktion zu erhalten, wurden 8 Std nach dem Versuch alle Platten zur Induktion mit UV (2 sec, 30 cm Abstand) bestrahlt; außerdem erhielten Platten mit besonders dichter *Try*8⁻-Einsaat (Versuchsreihen mit Phagen, die auf $\leq 25\%$ überlebendes Infektionsvermögen inaktiviert waren) den doppelten Galaktosezusatz.

d) *UV-Bestrahlung*. Die Phagen wurden in Konzentrationen von $1 \cdot 10^6$ bis $1,2 \cdot 10^7$ /ml, die Bakterien bei der Dichte von $2 \cdot 10^8$ /ml unter ständiger Durchmischung bestrahlt. Strahlungsquelle war eine Osram HNS 12 Hg-Niederdrucklampe (fast ausschließlich Ausstrahlung der Linie 2537 Å) in 30 cm Abstand. Die Dosisleistung betrug dabei $30,1 \text{ erg} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{sec}$.

e) *Medien*. P-Puffer: 1,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,5 g KH_2PO_4 ; 4,0 g NaCl; 5,0 g K_2SO_4 ; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% Gelatine; 1000 ml dest. Wasser; pH 6,6. — Bouillon: 8,0 g Difco nutrient broth und 4,0 g NaCl auf 1000 ml dest. Wasser. — Bouillonagar: 8,0 g Difco nutrient broth, 1,0 g NaCl und 15,0 g Agar auf 1000 ml dest. Wasser. Für den Bouillonagar mit Galaktose wurde dem fertigen, aufgeschmolzenen Medium 4,8 g Galaktose und 2,0 g K_2HPO_4 in steriler Lösung zugesetzt. — Weichagar: 3,8 g Difco nutrient broth, 5,0 g NaCl und 7,2 g Agar auf 1000 ml dest. Wasser. Alle Versuche wurden zur Vermeidung von Photoreaktivierung bei Gelblicht durchgeführt.

Ergebnisse

Bestrahlt man den gemäßigten Phagen P22 (Wildtyp) mit UV, adsorbiert die bestrahlten Phagen an stationäre *Try8*-Zellen in Multiplizität $\leq 1/100$ und plattet danach die gebildeten Komplexe (infizierte Bakterien) auf Indicatorplatten mit *Tgal*- als Indicator (siehe Methoden) aus, so beobachtet man bei zunehmender UV-Dosis folgendes (Abb. 1; Darstellung eines einzelnen Beispiels aus vielen derartigen Versuchen):

1. Die *Infektionen* (= Summe der ausgezählten Lysen + Lysogenisierungen), werden nach einer Mehrbereichsfunktion mit etwa 2 bis 3 Treffbereichen inaktiviert.

2. Die *Lysogenisierungen*, ausgedrückt in Prozenten der gesamten Infektionen bei der Dosis 0, nehmen zunächst rasch eintrefferartig ab; sodann biegt die Inaktivierungskurve jedoch in eine Gerade mit geringerer Endneigung um, die exakt der Endneigung der Mehrbereichsfunktion für die Inaktivierung der Infektionen gleicht. Die erhaltene Kurve hat mithin einen Verlauf, wie er formal bei der Inaktivierung einer Phagenpopulation mit zwei Sorten von Partikeln unterschiedlicher UV-Resistenz des Lysogenisierungsvermögens zu erwarten wäre.

3. Die *Lysen* (= Plaques; ausgedrückt in Prozenten der gesamten Infektionen bei der Dosis 0) steigen bei geringen UV-Dosen an und fallen danach parallel der Inaktivierungskurve für die gesamten Infektionen ab.

Da im Bereiche geringer UV-Dosen die Lysogenisierungen abnehmen, die Lysen indessen zunächst sogar zunehmen, ist zu folgern, daß das Gleichgewicht zwischen lytischen und lysogenen Infektionen zuungunsten letzterer verschoben wird. (Die gleiche Folgerung zogen bereits GAREN et al. (1955) aus einem nicht näher analysierten Experiment.) Mit anderen Worten: die UV-Bestrahlung vermindert die *Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K* (bei PRELL et al. 1959 als k_{Lyg} bezeichnet) eines einzelnen infizierenden Phagen.

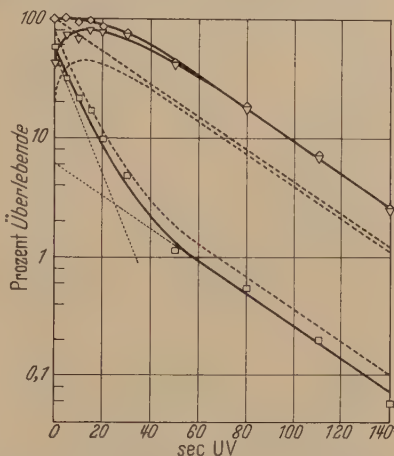


Abb. 1. UV-Inaktivierung von P 22. P 22 wurden mit verschiedenen Dosen UV bestrahlt und innerhalb 10 min an gewaschenen, in P-Puffer suspendierten stationären Zellen von *Try8*- bei 37° C adsorbiert. Anschließend wurden innerhalb 4 min die freien Phagen durch Verdünnung in Bouillon + Antiserum inaktiviert (10^{-3} Überlebende) und die Komplexe zusammen mit *Tgal*- als Indicator in Weichagar ausgeplattet. Die Multiplizität der Infektion war $\leq 0,01$. Die Summe aus Lysen (∇) und Lysogenisierungen (\square) wurden als Infektionen (\diamond) eingezeichnet. Ausgezogene Kurven: interpolierte experimentelle Werte; gestrichelte Kurven: für abortive Lysogenisierungen korrigierte Werte; gepunktete Geraden: Verlauf der graphisch ermittelten Inaktivierungsfunktionen $e^{-i \cdot D}$ und $e^{-r \cdot i \cdot D}$.

A. Inaktivierung des Lysogenisierungsvermögens

Die Inaktivierungskurve für Lysogenisierungen besteht aus der Summe von zwei Eintrefferrfunktionen, da keinerlei Andeutung eines konvexen Kurvenverlaufes zu erkennen ist. Der steile Anfangsteil entspricht vorwiegend der Funktion $e^{-i \cdot D}$, der flachere Endteil folgt der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$; r (< 1) bezeichnet den Dosisreduktionsfaktor, um den der „resistentere“ Populationsanteil inaktivierungsunempfindlicher ist als der „sensible“,

und i die Inaktivierungswahrscheinlichkeit je Doseinheit D . Ein Ansatzpunkt für die Zuordnung dieser formalen Reaktionsabläufe zu bestimmten Änderungen innerhalb der bestrahlten Phagenpopulation ergibt sich aus folgender Operation: Drückt man die nach verschiedenen UV-Dosen überlebenden Lysogenisierungen nicht in Prozenten der Infektionen bei der Dosis Null, sondern in Prozenten der bei der jeweiligen UV-Dosis noch überlebenden Infektionen aus, so erhält man die in Abb. 2 dargestellte Kurve. Da bei dieser Darstellungsart ein

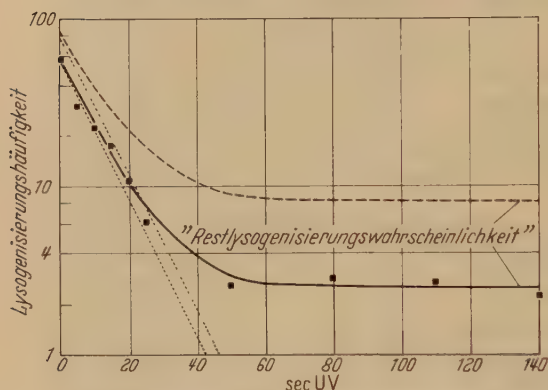


Abb. 2. Veränderung der relativen Häufigkeit von Lysogenisierungen unter allen überlebenden P 22-Infektionen nach UV-Bestrahlung. Die experimentellen Daten der Abb. 1 wurden als Veränderung der Lysogenisierungshäufigkeit in der bestrahlten Phagenpopulation (■) dargestellt. Ausgezogene Kurve: Interpolierte experimentelle Werte; gestrichelte Kurve: für abortive Lysogenisierungen korrigierte Werte. Die gepunkteten Geraden bezeichnen den jeweiligen reinen Abfall der Lysogenisierungen nach Abzug der „Restlysogenisierungen“

Verlust an Lysogenisierungen durch die Inaktivierung des gesamten Infektionsvermögens eines Phagen (also Lysogenisierungs- und Lysierungsvermögen) eliminiert wird, erhält man lediglich die uv-induzierte Verminderung der Lysogenisierungen unter den jeweils noch infektiösfähigen Phagen, d.h. die durch zunehmende UV-Bestrahlung erzeugte Verminderung der Lysogenisierungshäufigkeit innerhalb der Phagenpopulation. Diese Abnahme verläuft bei geringen Dosen eintreffertartig, mündet bei höheren Dosen jedoch in eine Waagerechte ein. Im Bereich der Waagerechten ist das Lysogenisierungsvermögen der bestrahlten, überlebenden Phagen offenbar uv-resistent. Durch die UV-Bestrahlung werden also Phagen mit hoher Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K in solche mit niedriger „Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit“ k „umgewandelt“, wobei K bereits durch einen einzigen UV-Schaden im Phagen auf k vermindert wird, während sich k seinerseits selbst bei hohen Dosen als uv-resistent erweist. Die bezüglich der Lysogenisierungswahrscheinlichkeit

ursprünglich einheitliche Phagenpopulation (Wahrscheinlichkeit K) wird demnach zunächst durch die UV-Bestrahlung in eine gemischte Population mit den Lysogenisierungswahrscheinlichkeiten K und k umgewandelt. Erst bei hohen Dosen sind dann alle Phagen in solche mit Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k umgewandelt. — Die nahe-liegende Vermutung, daß die Population bereits ursprünglich aus Phagen mit Lysogenisierungswahrscheinlichkeiten K und k besteht, kann ausgeschlossen werden; denn der Anteil der Phagen mit k variiert mit den physiologischen Bedingungen des Lysogenisierungsversuches.

Die eintrefferartige Umwandlungsfunktion für K in k wird deutlich erkennbar, wenn man von den bei den verschiedenen Dosen experimentell ermittelten Lysogenisierungshäufigkeiten die ihnen jeweils überlagerte Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k abzieht. Man erhält dann die in Abb. 2 gepunkteten Geraden [jeweils mit oder ohne Korrektur für abortive (siehe unten) Lysogenisierungen]. Unter normalen physiologischen Bedingungen in Bouillon (siehe Methoden) betrug k in sechs verschiedenen Versuchen zwischen 0,02 und 0,04, während K , die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit ungeschädigter Phagen, zwischen 0,58 und 0,34 schwankte. Entsprechend dieser Umwandlung von K in k wird die Lysierungswahrscheinlichkeit erhöht: Der relativen Verminderung lysogener Infektionen entspricht also eine relative wie auch absolute (Abb. 1) Erhöhung der lytischen Infektionen.

Die in Abb. 1 dargestellte Überlebenskurve lysogener Infektionen innerhalb der bestrahlten Phagenpopulation setzt sich mithin zusammen aus der Überlagerung zweier Inaktivierungsabläufe, die jeweils durch einen einzigen UV-Schaden erzeugt werden können: 1. Die Verminderung der Ausbeute an lysogenen Infektionen durch vollständige Inaktivierung des Phagen nach der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$ und 2. die Verminderung lysogener Infektionen zugunsten lytischer infolge der Verringerung von K auf k plus die Inaktivierung nach der Funktion 1, welches zusammen die Funktion $e^{-i \cdot D}$ ergibt. Daraus folgt: Bei geringen UV-Dosen (< 20 sec) dominiert in der Inaktivierungskurve die Umwandlung der Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K in k . Bei Dosen von > 60 sec UV haben mithin praktisch alle Phagen der Population durch einen oder mehrere UV-Schäden in der wirtsreaktivarbaren Region B bereits die verminderte bzw. unter den gegebenen Bedingungen „geringstmögliche“ Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k , und sie werden von nun an nach der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$ völlig infektionsunfähig gemacht. Die Kurve verläuft damit auch parallel zum linearen Endteil der Inaktivierungskurve der gesamten Infektionen (Abb. 1). Im Anfangsteil ist letztere allerdings nicht ebenfalls linear, wie eigentlich zu erwarten, sondern mehrtreffbereichsartig gekrümmt. Dies ist jedoch nur die Folge von in Lysen umgewandelten abortiven Lysogenisierungen, wie im Abschnitt B

zu zeigen sein wird; ermittelt man die abortiven Lysogenisierungen und bezieht sie in den Inaktivierungsverlauf mit ein, so erhält man die in Abb. 1 gestrichelt eingetragenen Kurven für Lysen, Lysogenisierungen und die Summe beider, die gesamten Infektionen.

Da der Funktion $e^{-i \cdot D}$ die UV-Empfindlichkeit der gesamten DNS des P22 zugrunde liegen dürfte, muß rein formal geschlossen werden, daß für die langsamer, nach der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$ verlaufende Inaktivierung der Lysogenisierungen mit Wahrscheinlichkeit k — ebenso wie für die Inaktivierung des gesamten Infektionsvermögens (Lysen + Lysogenisierungen) — entweder nur der kleine DNS-Bereich r verantwortlich sein kann oder zwar die gesamte DNS, jedoch mit einer *Dosisreduktion* um den Faktor r . Letztere Alternative erscheint plausibler, da es sich ja bei K und k um die Inaktivierung der gleichen Funktion des P22 handelt, nämlich die Lysogenisierung.

Bei P22 und dem *E. coli*-Phagen λ konnte bereits eine derartige Dosisreduktion nachgewiesen werden (GAREN et al. 1955; KELLENBERGER u. WEIGLE 1958), da ein Teil der UV-Schäden der Phagen durch das Wirtsbakterium reaktiviert werden kann. Nach einer experimentell gut fundierten Theorie wird diese WR durch Rekombination zwischen geschädigter Phagen-DNS und ungeschädigter homologer Bakterien-DNS bewerkstelligt (STENT 1958). Bereits GAREN et al. (1955) konnten wahrscheinlich machen, daß die auffällig große UV-Resistenz einer Klarplaque-mutante des P22 im Vergleich zu ihrem DNS-Gehalt und dem des Coliphagen T2 auf einer rekombinativen Wirtsreaktivierung (WR) der UV-Schäden beruht; denn nach Verhinderung der WR durch Bestrahlung der Bakterien erhielten die Autoren eine Inaktivierungsfunktion für bestrahlte P22, die ihrem DNS-Gehalt entsprach.

Die in beiden Dosisbereichen unterschiedlichen Inaktivierungsfunktionen können nun ebenfalls auf der Basis einer WR erklärt werden. Wie unten zu zeigen sein wird, führt dies trotz der Verwendung einer völlig anderen Versuchsanordnung als bei GAREN et al. (1955) zu quantitativ gleichartigen Aussagen. Die unter Zugrundelegung einer rekombinativen WR sich ergebende Modellvorstellung sei im folgenden skizziert: Die Inaktivierungsfunktion mit der starken UV-Empfindlichkeit entspricht der gesamten tatsächlichen UV-Empfindlichkeit der DNS, ohne daß eine WR der Schäden stattgefunden hat. Unter dieser Voraussetzung beschreibt die steile Inaktivierungsfunktion $e^{-i \cdot D}$ die „wahre“ Empfindlichkeit der gesamten Phagen-DNS. Die Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$, welche die Inaktivierung der Phagen mit uv-unempfindlicher Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k beschreibt, entspricht demjenigen Bruchteil der gesamten Schäden, der keine WR erfahren kann. Diese nicht reaktivierbaren Schäden befinden sich innerhalb der Phagen-DNS in einer speziellen Region A (GAREN et al. 1955), die jedoch

nicht notwendigerweise eine durchgehende Struktur darstellen muß. Wenn man annimmt, daß die reaktivierbaren Schäden in einer Region B liegen und zu 100% rekombinativ reaktiviert werden können, dann entspricht der Anteil der Region A am gesamten uv-empfindlichen Material des Phagen (Region A und B) dem Dosisreduktionsfaktor r . — Dieser betrug in unseren Versuchen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

Tabelle 1. Hohe Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K , niedrige Lysogenisierungswahrscheinlichkeit k (= Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit) und Dosisreduktionsfaktor r bei P 22 unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

Versuch	Behandlung	k	K	r
51	37°C	2,5	50,5	0,259
63	37°C	3,1	34,3	0,259
69	37°C	2,1	43,4	0,268
70	37°C	2,6	57,9	0,277
71	37°C	3,9	48,5	0,250
	25,5°C	2,4	43,7	0,250
72	37°C	3,3	38,6	0,271
	37°C; 5 sec UV auf Bakterien vor Infektion	2,6	25,7	0,271
81	37°C	3,0	37,3	0,262
	37°C + 5 min CMP ¹	8,0	63,0	0,262
84	37°C	4,0	46,0	0,266
	37°C + 5 min CMP ¹	7,5	78,2	0,266
79	37°C	1,7	36,2	0,234
	37°C + 10 min CMP ¹	16,0	79,3	0,234
	37°C; ermittelt aus dem einzigen gleichartigen Versuch von GAREN u. ZINDER (1955); logarithmisch wachsende LT_2 -Zellen	19	50	0,28

¹ CMP = Chloramphenicol; 25 µg/ml in Bouillon; es wurde geboten 5 min nach Übertragung der Komplexe aus der Adsorptionsmischung in Bouillon + Antiserum.

im Mittel 0,26 (Tab. 1). GAREN et al. (1955) bestimmten den nicht wirtsreaktivierbaren Anteil des uv-empfindlichen Materials einer Klarplaque-mutante des P 22 (Verlust des Lysogenisierungsvermögens) zu etwa 0,25, indem sie die WR-Kapazität der Wirtsbakterien durch UV-Bestrahlung zerstörten; auf solchen WR-unfähigen Bakterien erschien also die UV-Empfindlichkeit des P 22 viermal größer. Die quantitative Übereinstimmung der auf so verschiedenen Wegen bestimmten wirtsreaktivierbaren Genomanteile des P 22 kann als zwingender Hinweis dafür gewertet werden, daß in beiden Versuchen die rekombinative WR der uv-geschädigten Region B des Phagen erfaßt wurde.

Angewendet auf die Inaktivierung der Lysogenisierungen durch UV-Bestrahlung des P 22 läßt sich mithin folgendes Bild entwerfen: Erleidet ein Phage durch UV-Bestrahlung in Region B einen Schaden, so wird

dieser durch homologes genetisches Material des Wirtsbakteriums rekombinativ reaktiviert. Der Phage hat damit zwar sein Infektionsvermögen wiedererlangt, d.h. er überlebt den Schaden; sein Infektionsvermögen ist jedoch qualitativ verändert: Er kann nicht mehr mit der hohen Wahrscheinlichkeit K lysogenisieren, sondern nur noch mit der geringen Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k , während die lytischen Infektionen

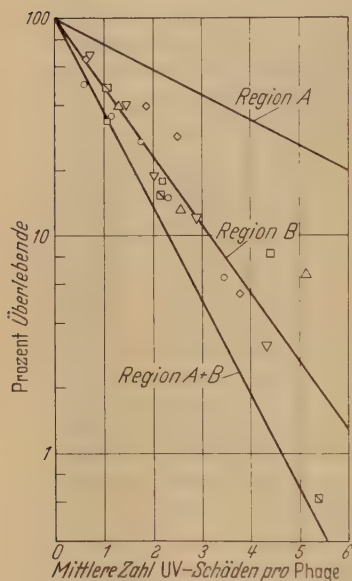


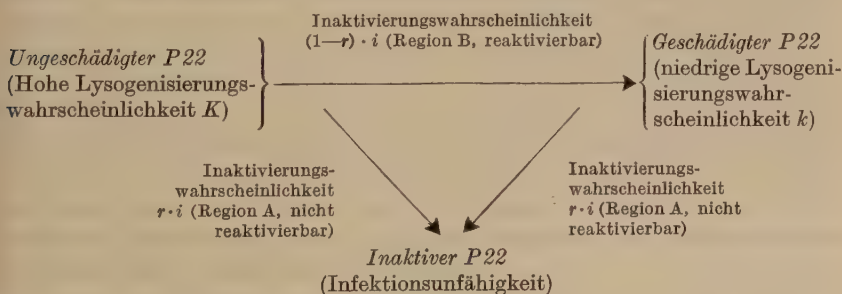
Abb. 3. UV-Inaktivierung des Lysogenisierungsvermögens des P22. Von den bei verschiedenen UV-Dosen (mittlere Trefferzahl je Phage) experimentell erhaltenen Lysogenisierungshäufigkeiten wurde die graphisch ermittelte Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k abgezogen. Die verschiedenen Symbole entsprechen Werten aus sechs Versuchen unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 1. Ausgezogene Kurven: aus 10 Versuchen durch Mittelwertbildung errechnete UV-Empfindlichkeiten für die DNS-Regionen A, B und A + B

infolge dieser Gleichgewichtsverschiebung um einen entsprechenden Betrag zunehmen. Verwendet man also als Kriterium für die Eigenschaften eines UV-Schadens in Region B die Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k , so erscheint der Schaden vollständig reparabel; dient zur Beschreibung jedoch die normale Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K , so erscheint der Schaden nicht reaktivierbar. — Ereignet sich die UV-Schädigung in Region A, was jedoch wegen ihrer geringen Ausdehnung entsprechend dem Dosisreduktionsfaktor r seltener eintreten wird, dann ist der Schaden nicht reparierbar: der Phage verliert seine gesamte Infektionsfähigkeit, d.h. sowohl das Lysierungs- als auch das Lysogenisierungsvermögen (siehe Abb. 1, Parallelität der Infektions- und Lysogenisierungsinaktivierungskurve bei UV-Dosen > 60 sec). Die Größen der Regionen A und A + B lassen sich aus den Neigungen der beiden Eintrefferfunktionen in Abb. 1 (gepunktete Linien) bestimmen. Setzt man die Neigung der Inaktivierungsfunktion von Region A + B gleich 1, so ergibt sich, wie bereits erwähnt, die Neigung für Region A allein als Dosisreduktionsfaktor von $r = 0,26$. Die Inaktivierungsfunktion von Region B weist dementsprechend die Neigung 0,74 auf. Dies ergibt sich aus Abb. 3 (Punkte aus sechs

verschiedenen Versuchen). Dort wurde die nicht wirtsreaktivierbare Verminderung der Lysogenisierungshäufigkeit K innerhalb der überlebenden Phagenpopulation (d.h. also bei Phagen mit ungeschädigter Region A) unter Eliminierung der Restlysogenisierungen (S. 74) mit zunehmender Dosis aufgetragen, mit anderen Worten, es wurden die noch „überlebenden“ bzw. ungeschädigten Regionen B in der

bestrahlten Phagenpopulation bestimmt. Als Dosiseinheit diene, da die Bestrahlungszeit für eine Inaktivierungsdosis (e^{-1}) nicht in allen Versuchen völlig gleich war, die mittlere Zahl UV-Schäden je Phage. Letztere war für jeden einzelnen Versuch abzuleiten aus der Neigung der Inaktivierungsfunktion $e^{-i \cdot D}$ (Abb. 1, steile gepunktete Linie), d. h. der Empfindlichkeit der Regionen A + B (Abb. 3). Jedes Symbol in Abb. 3 entspricht dabei einem gemessenen Versuchspunkt, von dem jedoch die in jedem einzelnen Versuch graphisch bestimmte mittlere Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit (siehe Abb. 2) abgezogen wurde. Wenn man in Rechnung setzt, daß hier einzelne, besonders bei höheren UV-Dosen mit erheblichen Fehlern belastete Einzelwerte (Lysogenisierungsprozentsätze von 2–5% bei 50–100 Komplexen je Platte, korrigiert für eine wie in Abb. 2 ermittelte Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit) mit einem Mittelwert aus sechs ganz verschiedenen Versuchen verglichen werden, dann streuen die Punkte mit befriedigender Genauigkeit um die theoretisch erwartete Neigung für $1 - r = 0,74$. Die in Abb. 2 gepunkteten Geraden des einzelnen Versuches ergaben sich aus der gleichen Berechnung innerhalb eines einzelnen Versuches, nur wurden sie dort als der Prozentsatz lysogen, mit Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K infizierender Phagen aufgetragen, in Abb. 3 jedoch als Prozent „überlebende Region B“.

Die verschiedenen Wahrscheinlichkeiten für eine UV-Inaktivierung der zwei DNS-Regionen des P 22 bei einer Gesamtempfindlichkeit i seiner DNS sowie die phänotypische Ausprägung der Schäden läßt sich in folgendem Schema zusammenfassen:



B. Inaktivierung des Infektionsvermögens

Die Inaktivierungsfunktion der gesamten Infektionen (Abb. 1 \diamond) verläuft merkwürdigerweise nicht eintrefferartig, sondern entspricht einer Mehrtreffbereichskurve mit 2–3 Treffbereichen. Erst im linearen Kurvenbereich bei Dosen > 50 sec erkennt man die Parallelität zu den Restlysogenisierungen, in deren Bereich Infektionen (Lysen + Restlysogenisierungen) und Restlysogenisierungen allein mit gleicher Wahrscheinlichkeit inaktiviert werden. Auffällig ist weiterhin, daß die Treffbereichszahl

von Versuch zu Versuch wechselt und bei logarithmisch wachsenden Bakterien sogar auf nahezu 1 sinkt. Da bei der Inaktivierung der Lyso-genisierungen keine konvexe Krümmung zu beobachten ist, muß die Mehrtreffbereichsabtötung der Infektionen ausschließlich mit der Abtötung der Lysen zusammenhängen. Die Annahme, daß das lytische Infektionsvermögen der Phagen mit grundsätzlich anderer Kinetik abgetötet wird als das lysogene, erscheint wenig plausibel, zumal diese Kinetik mit dem physiologischen Zustand des Wirtsbakteriums variiert. Viel überzeugender ist die Annahme, daß die Infektionen wie die Lyso-genisierungen eintrefferartig abfallen, diese Kinetik jedoch durch das Auftreten „zusätzlicher“ Lysen überdeckt wird. Nach dieser Modellvorstellung würden durch die UV-Wirkung *Lysen* „geweckt“, die ohne UV nicht im Infektionstiter einer Phagensuspension auszuzählen sind. In Abb. 4 ist für den in Abb. 1 dargestellten Versuch eine solche Teilung der Mehrtreffbereichsinaktivierung der Infektionen in eine theoretische Eintrefferabtötung der Infektionen und eine ihr überlagerte, uv-induzierte „Weckung“ und Abtötung von Lysen vorgenommen. Aus der sich ergebenden Maximumkurve geht hervor, daß die „Weckung“ wesentlich uv-empfindlicher ist als die gleichzeitig ablaufende Tötung, die ja der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$ folgt.

Für die Aufklärung des *Weckvorganges* schien es sinnvoll, seine UV-Empfindlichkeit zu bestimmen, d.h. die Abnahme der „weckbaren“, also „noch nicht geweckten“ Phagen in Abhängigkeit von der UV-Dosis zu bestimmen. Die Gesamtzahl der weckbaren Phagen ergibt sich aus der Differenz zwischen den graphisch ermittelten Überlebenden der theoretischen Eintrefferinaktivierung für sämtliche vorhandene Phagen (= zur Dosis 0 rückextrapolierte Mehrtreffbereichskurve der experimentellen Infektionsinaktivierung, wobei die Treffbereichszahl n gleich 100 % Phagen bei Dosis 0 eingesetzt wurde) und den experimentell bestimmten überlebenden Infektionen. In Abb. 5 sind die entsprechenden experimentellen Punkte aus sechs verschiedenen Versuchen eingetragen; die gestrichelte Linie stellt die graphische Interpolation der experimentellen Werte dar. Ihre Endneigung ist geringer als die der gesamten Strahlenempfindlichkeit des Phagen (Region A+B), jedoch gleich der für Region B.

Welche Schlüsse gestattet diese Feststellung? LIEB (1953) hatte am System *E. coli*-Phage λ gezeigt, daß bei Temperaturen über 37° C lysogene Infektionen abortiv verlaufen können. Im Abschnitt A unserer Arbeit war nachgewiesen worden, daß durch UV-Bestrahlung der Phagen potentielle Lysogenisierungen in Lysen umgewandelt werden können. Macht man nun die durchaus plausible Annahme, daß unter unseren Versuchsbedingungen ein gewisser Prozentsatz der lysogenen Infektionen abortiv verläuft, dann zählt man also im Lysogenisierungsversuch ohne voraus-

gehende UV-Bestrahlung der Phagen „zu wenig“ Infektionen. Bei Applizierung geringer UV-Dosen, die noch keine wesentliche Phageninaktivierung zur Folge haben, werden jedoch potentielle und damit auch ein großer Anteil der später abortiv verlaufenden Lysogenisierungen in Lysen umgewandelt. Dadurch wird aber die Zahl der auszählbaren Lysen

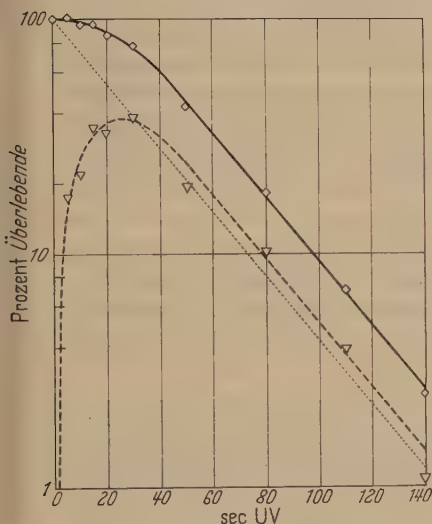


Abb. 4

Abb. 4. „Weckung“ zusätzlicher lytischer Infektionen aus potentiell abortiv lysogenisierenden P22 durch UV-Bestrahlung. Umrechnung der experimentellen Werte des Versuches aus Abb. 1. \diamond Infektionen (Lysen + Lysogenisierungen); ausgezogen: interpolierte Kurve. ∇ Durch UV-Bestrahlung in lytische Infektionen umgewandelte, potentiell abortiv lysogen infizierende P22; gestrichelt: aus der Infektionskurve errechnete „Weckkurve“, d. h. „zusätzliche“ Lysen. Gepunktet: theoretische Eintrefferinaktivierung ohne Anwesenheit potentiell abortiv lysogenisierender Phagen

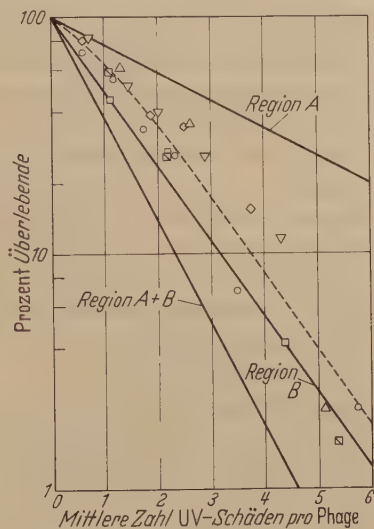


Abb. 5

Abb. 5. UV-Inaktivierung des abortiven Lysogenisierungsvermögens von P22. Die verschiedenen Symbole stellen die aus sechs Versuchen errechneten experimentellen Werte für die Inaktivierung abortiv lysogener Infektionen dar (gleiche Versuche und Symbole wie Abb. 3). Gestrichelte Kurve: graphisch interpolierte Versuchswerte; ausgezogene Kurven: errechnete UV-Empfindlichkeiten für die DNS-Regionen A, B und A + B wie in Abb. 3

stärker erhöht als lediglich durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Lysen und Lysogenisierungen.

Wenn diese Hypothese zutrifft, sollte erwartet werden, daß die UV-Empfindlichkeit des „Weckvorganges“ gleich derjenigen der Region B ist; denn nur Treffer in Region B vermögen eine potentielle Lysogenisierung (abortiv oder normal verlaufend) in eine Lyse zu verwandeln. Es läßt sich auch tatsächlich zeigen (Abb. 5), daß die experimentell bestimmte UV-Empfindlichkeit dem theoretisch für Region B erwarteten Wert von $1 - r$ entspricht. Die relativ große Streuung der experimentellen Punkte bei höheren UV-Dosen erklärt sich aus methodischen Schwierigkeiten. Die im Anfangsteil der Kurve beobachtete leicht konvexe

Krümmung wird dadurch verursacht, daß nicht alle abortiven Lysogenisierungen durch UV-Schäden in Region B in Lysen umgewandelt werden, sondern nur der Anteil $(K-k)/K$; es bleiben mithin entsprechend der Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k noch einige abortive Lysogenisierungen „ungeweckt“.

Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, daß abortive Lysogenisierungen vom physiologischen Zustand der infizierten Zelle abhängige „Unglücksfälle“ darstellen, die sich nach bereits erfolgter Entscheidung für Lysogenisierung, d.h. der Etablierung des prälysogenen Zustandes, ereignen. Im Gegensatz zu den Erfahrungen LIEBS (1953) beim Phagen λ wird der Anteil der abortiv lysogenisierenden Phagen unter sämtlichen Infektionen bei 25°C (10 min Adsorption + 4 min in Antiserum) nicht geringer; die Absolutzahl der Infektionen ist jedoch doppelt so groß. — Daß die abortiven Infektionen identisch mit den bei hoher Multiplizität von LURIA, FRASER, ADAMS u. BURROUS (1958) gefundenen „unstabilen“ Lysogenisierungen des P22 sind, ist ebenfalls unwahrscheinlich, da nach den Erfahrungen der Autoren bei 37°C wesentlich mehr instabile Klone gefunden werden als bei 26°C.

Die experimentell bestimmten Lysogenisierungen und Lysen gestatten also keine direkte Bestimmung der „wahren“ Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K bzw. k ; denn bei unbestrahlten Phagen zählt man zu wenig Lysogenisierungen aus, da die abortiven fehlen, bei UV-bestrahlten „zu viele“ Lysen (zu Lysen umgewandelte potentielle abortive Lysogenisierungen) und ebenfalls zu wenig Lysogenisierungen (abortive fehlen). Man kann indessen die experimentellen Werte entsprechend korrigieren: In Abb. 1 sind die korrigierten Infektionen, Lysogenisierungen und Lysen gestrichelt eingetragen, wobei der Anteil der Lysogenisierungen unter bestimmten Annahmen (siehe unten) systematisch um einen Faktor F über der experimentell ermittelten Kurve liegt.

In Abb. 2 ist in entsprechender Weise die Veränderung der Lysogenisierungshäufigkeit innerhalb der bestrahlten Phagenpopulation unter Einsetzung der „wahren“ Inaktivierungswerte eingezeichnet (gestrichelte Kurve). — Diese Korrekturen ändern natürlich nichts an den Neigungen der Inaktivierungskurven; alle UV-Empfindlichkeitsbestimmungen bleiben davon unberührt, und es ist gleichgültig, ob sie an unkorrigierten oder korrigierten Inaktivierungskurven gewonnen wurden. Lediglich K und k werden etwas erhöht, was jedoch die aus ihnen abgeleiteten Schlüsse nicht beeinträchtigt.

Den Rechenoperationen für die Korrekturen liegen folgende Überlegungen zugrunde: Bei den *lysogenen Infektionen* wurde angenommen, daß sie alle einen konstanten Anteil an abortiv verlaufenden Infektionen enthalten; um diesen Faktor F liegen die ausgezählten Lysogenisierungen unter der Anzahl der gesamten *eingeleiteten* Lysogenisierungen. Der Faktor F errechnet sich als $(\text{Lyg} + n - 1)/\text{Lyg}$, wobei

Lyg den Anteil der direkt auszählbaren Lysogenisierungen unter den Infektionen, n die experimentell bestimmte Treffbereichszahl der Infektionsinaktivierung und $n-1$ den (auf die ausgezählten Infektionen bezogenen) Anteil an abortiven (= nicht direkt auszählbaren) Lysogenisierungen bezeichnet. — Die Inaktivierung der *gesamten Infektionen*, welche unter Einschluß der abortiven einer Eintrefferkinetik folgen muß, läßt sich entweder graphisch aus der für die Dosis null rückextrapolierten experimentellen Mehrtreffbereichskurve bestimmen oder aus der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$ ermitteln, wobei r der graphisch ermittelte Dosisreduktionsfaktor ist. — Die *Lysen* errechnen sich dann aus der Differenz zwischen den korrigierten Werten für Infektionen und Lysogenisierungen. — Alle entsprechenden Kurven sind in Abb. 1 gestrichelt eingezeichnet. Aus den in Abb. 1 dargestellten „wahren“ Inaktivierungsabläufen kann man weiterhin die „wahren“ Lysogenisierungshäufigkeiten in der bestrahlten Phagerpopulation ermitteln, aus denen sich dann die „wahren“ K und k ablesen lassen (Abb. 2, gestrichelte Kurve).

C. Restlysogenisierungen

Im Abschnitt A war dargelegt worden, daß Phagen mit einem oder mehreren UV-Schäden in Region B nur noch die sogenannte „Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit“ k besitzen und nach der Funktion $e^{-r \cdot i \cdot D}$ abgetötet werden. Daraus ergibt sich, daß k völlig UV-unempfindlich ist. Dies steht in auffälligem Gegensatz zum Verhalten ungeschädigter Phagen, deren Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K bereits durch einen einzigen UV-Schaden auf das jeweils „geringstmögliche“ k erniedrigt wird. Die einfachste Deutung dieses Tatbestandes besteht zunächst rein formal in der Annahme unterschiedlicher Lysogenisierungsabläufe nach Infektion mit UV-geschädigten und ungeschädigten Phagen. Um diese Unterschiede näher charakterisieren zu können, wurde versucht, k im UV-Versuch experimentell zu verändern. Aus einer experimentellen Beeinflussung der UV-resistenten Restlysogenisierungen sollte sich dann ein Ansatzpunkt für eine Modellvorstellung ergeben, in der die „normale“ Lysogenisierung und „Restlysogenisierung“ unter einheitlichen Gesichtspunkten eingeordnet werden können.

Die Ergebnisse des Abschnittes A hatten erkennen lassen, daß ein wirtsreaktivierbarer Schaden in Region B eine mit der Wahrscheinlichkeit K stattfindende Lysogenisierung verhindert und nur noch eine Lysogenisierung mit der Wahrscheinlichkeit k zuläßt. Für eine Lysogenisierung — zumindest mit der Chance K — ist also ein ungeschädigtes Phagen genom erforderlich. Wenn dies aber für Lysogenisierungen mit der Chance K gilt, ist nicht einzusehen, warum das nicht auch für Lysogenisierungen mit Chance k , also die Restlysogenisierungen, gelten sollte; denn es handelt sich jeweils um die gleiche Funktion, und die entstehenden lysogenen Kolonien unterscheiden sich nicht voneinander. Da aber bei hohen UV-Dosen praktisch alle Phagen geschädigt sind, dessen ungeachtet aber weit mehr Lysogenisierungen auftreten als noch ungeschädigte Phagen vorhanden sind, müssen also auch noch nach WR

von UV-Schäden in der Region B Lysogenisierungen möglich sein. Die Verhinderung der Lysogenisierung (Wahrscheinlichkeit K) könnte dann aber darauf beruhen, daß die Anfangsschritte der lytischen Phagenentwicklung trotz UV-Schadens in Region B des Phagen anlaufen können, während die zur Lysogenisierung bzw. zunächst zum prälysogenen Zustand führenden Schritte erst anlaufen können nach rekombinativem Ersatz des UV-geschädigten Phagenmaterials durch homologes Wirtsmaterial. Diese wegen der vorgelagerten WR sehr „spät“ ablaufenden „lysogenen“ Reaktionsschritte führen dabei nur noch in denjenigen Zellen zur Herstellung des prälysogenen Zustandes, in welchen die lytische Phagenentwicklung noch zugunsten lysogener Reaktionen unterdrückt werden kann (PRELL et al. 1959). Die nach UV-Bestrahlung auftretenden „Restlysogenisierungen“ sind mithin solche „späten“ Lysogenisierungen und zeigen dementsprechend in ihrer Überlebensfunktion als Folge der vorausgegangenen WR die zu erwartende Dosisreduktion um den Faktor r . — Da die Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit der überlebenden Phagen in den untersuchten Bereichen dosisunabhängig ist, ist die Effektivität der WR merkwürdigerweise unabhängig von der Zahl der UV-Läsionen in Region B. Bei noch höheren Dosen, bei denen mit unserer Methodik jedoch keine Bestimmung der Lysogenisierungen mehr möglich ist, könnte man jedoch eine Dosisabhängigkeit von k vermuten; denn GAREN et al. (1955) beobachteten bei sehr hohen Dosen infolge der Akkumulierung von Schäden in Region B eine langsame Erhöhung des Dosisreduktionsfaktors auf Werte über 0,25, d.h. eine allmählich zunehmende Neigung der Inaktivierungskurve der Infektionen.

Da die WR von UV-Schäden in Region B offenbar selektiv die zur Lysogenisierung führenden Reaktionsschritte behindert, sollte man erwarten, daß umgekehrt bei einer Behinderung der lytischen Phagenentwicklung, aber ungestörter Rekombination zwischen Wirt und Phage, die Lysogenisierungschance k der geschädigten Phagen erhöht wird. Ein geeignetes Stoffwechselgift für die Herstellung solcher Bedingungen ist CMP (Chloramphenicol), das nach den Untersuchungen von TOMIZAWA u. SUNAKAWA (1956), TOMIZAWA (1958), HERSHEY, BURGI u. STREISINGER (1958) und THOMAS (1959) die lytische Phagenentwicklung teilweise blockiert: Während DNS-Synthese und genetische Rekombinationen zwischen verschiedenen Phagengenomen unter CMP-Einwirkung ungehindert weiterlaufen, wird die Reifung der Phagen in Gegenwart des Giftes verhindert. Voraussetzung für diese Wirkung des CMP ist allerdings, daß es erst einige Minuten nach erfolgter Infektion der Zellen geboten wird, d.h. nach der sogenannten „frühen (early) Proteinsynthese“ (TOMIZAWA et al. 1956), die erst die Voraussetzung für eine DNS-Synthese bzw. genetische Rekombinationen schafft.

Das Ergebnis eines *UV-Inaktivierungsversuches unter Chloramphenicol-einfluß*, bei dem die Komplexe nach Adsorption in Puffer und anschließender Inaktivierung der freien Phagen in Antiserum entweder 5 min in Bouillon oder 5 min in Bouillon + 25 µg CMP/ml gehalten wurden, ist in Abb. 6 dargestellt. Aus dem Versuch geht folgendes hervor:

1. Die Inaktivierung der *Infektionen* durch UV werden in Anwesenheit von CMP im Vergleich mit der Kontrolle in Bouillon *nicht verändert*.

2. *K* der ungeschädigten Phagen (Dosis 0) steigt unter CMP-Einwirkung von 0,37 auf 0,63, also um den Faktor 1,7 (siehe auch BERTANI 1957).

3. Die *Restlysogenisierungen* liegen nach CMP-Behandlung wesentlich *höher*. Die graphische Extrapolation ergibt (Prinzip wie in Abb. 2) *k* in der Kontrolle gleich 0,030, in CMP 0,080; es tritt also eine Steigerung um den Faktor 2,7 ein.

4. Die beiden Funktionen, denen die Abnahme der Lysogenisierungen folgt ($e^{-i \cdot D}$ und $e^{-r \cdot i \cdot D}$), zeigen innerhalb der Versuchsgenauigkeit identische Neigungen in der Kontrolle und unter CMP-Einwirkung.

Daraus kann geschlossen werden, daß durch CMP lediglich die Lysogenisierungschancen *K* und *k* erhöht werden; die UV-Empfindlichkeit der verschiedenen DNS-Regionen sowie die Inaktivierungskinetik bleiben unverändert. Die beobachtete Erhöhung der Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit *k* durch die CMP-Wirkung kann

weiterhin als Hinweis dafür gewertet werden, daß die ihrer Erhöhung zugrunde liegenden WR-Vorgänge tatsächlich rekombinativer Natur sind.

Wenn CMP die lytische Phagenentwicklung teilweise blockiert, ohne die genetischen Rekombinationsereignisse zu behindern, dann sollte bei zunehmender Dauer der CMP-Behandlung die Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit *k* erhöht werden. Dies ist auch tatsächlich der Fall, wie aus Tab. 2 hervorgeht: Das Lysogenisierungsvermögen unbestrahlter und mit einer Dosis von 70 sec UV bestrahlter Phagen wurde jeweils nach

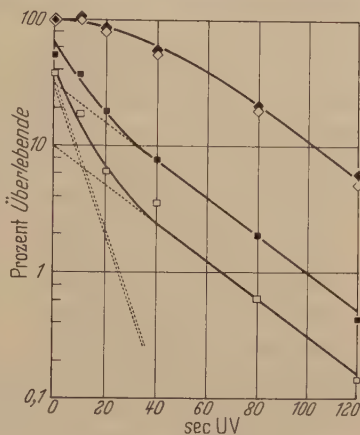


Abb. 6. UV-Inaktivierungskurven von P 22 ohne und mit vorausgegangener Chloramphenicolbehandlung der Komplexe. P 22 wurde mit verschiedenen Dosen UV bestrahlt und danach 10 min an gewaschenen, in P-Puffer suspendierten stationären Zellen von *Try8*-adsorbiert. Die Inaktivierung der freien Phagen erfolgte anschließend durch Verdünnung in Bouillon + Antiserum (5 min, 10^{-8} Überlebende). Dann wurde der eine derartige Versuchsansatz für 5 min in Bouillon bei 37° C bebrütet (leere Symbole ◇, □), der andere 5 min in Bouillon + 25 µg/ml Chloramphenicol (ausgefüllte Symbole ◆, ■). Die Ausplattung der Komplexe erfolgte wie üblich (siehe Unterschrift Abb. 1). Der Klarheit halber wurden jedoch nur die Infektionen (◇, ◆) und Lysogenisierungen (□, ■) eingezeichnet. Ausgezogene Kurven: interpolierte experimentelle Werte; gepunktete Kurven: Verlauf der graphisch ermittelten Inaktivierungsfunktionen $e^{-i \cdot D}$ und $e^{-r \cdot i \cdot D}$.

Aufenthalt von 5, 10 und 15 min in Bouillon oder Bouillon + CMP bestimmt: Während k ebenso wie K mit steigender Behandlungszeit in Bouillon ohne CMP etwas abnehmen (infolge des verlängerten Aufenthaltes in 37°C), tritt mit zunehmender Dauer der Behandlung in Bouillon mit CMP eine erhebliche Erhöhung von k ein, während in der

Tabelle 2

Einfluß der Behandlung der Komplexe in Bouillon oder Bouillon + Chloramphenicol (CMP) auf das Lysogenisierungsvermögen unbestrahlter und bestrahlter P22

Minuten Behandlung	Bouillon				Bouillon + CMP (25 µg/ml)			
	Kontrolle		70 sec UV-Bestrahlung		Kontrolle		70 sec UV-Bestrahlung	
	K	f	k	f	K	f	k	f
5	048	1,00	0,038	1,00	0,79	1,00	0,10	1,00
10	0,41	0,86	0,033	0,87	0,87	1,11	0,21	2,10
15	0,34	0,72	0,025	0,65	0,84	1,07	0,33	3,29

Stationäre Zellen von *Try8*⁻ wurden nach Waschen und Suspendierung in P-Puffer (etwa $3,5 \cdot 10^8$ /ml) 70 sec mit UV bestrahlt und anschließend mit unbestrahlten P22 (Multiplizität der Infektion $\leq 0,01$) infiziert: nach 10 min Adsorption in P-Puffer wurden die freien Phagen durch Verdünnung in Bouillon + Antiserum inaktiviert (5 min; 10^{-2} Überlebende). Anschließend folgte eine Bebrütung der Komplexe für 5, 10 oder 15 min in Bouillon oder Bouillon + Chloramphenicol (25 µg/ml) bei 37°C. Danach wurden die Komplexe mit *Tgal*⁻ als Indicator ausgeplattet und die Lysen und Lysogenisierungen ausgezählt. Die Lysogenisierungswahrscheinlichkeiten K und k unbestrahlter bzw. UV-bestrahlter Bakterien können unter diesen Bedingungen direkt aus der Lysogenisierungshäufigkeit innerhalb der infizierten Bakterienpopulation bestimmt werden. — f bezeichnet den Faktor, um den K bzw. k durch die Behandlungsdauer verändert wird.

unbestrahlten Kontrolle nur ein ganz geringer Anstieg von K zu beobachten ist. Bei Behandlung von Komplexen aus verschiedenen stark UV-geschädigten P22 mit CMP für länger als 10 min verschwindet dann der in Abb.6 nach 5 min CMP-Behandlung nur noch schwach ausgebildete Knick in der Inaktivierungskurve der Lysogenisierungen praktisch völlig.

D. Zusammenarbeit zwischen Phage und Bakterium beim Lysogenisierungsvorgang

Die im Abschnitt C dargestellten Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß für die Lysogenisierung ein vollständiges, völlig intaktes Phagengenom nötig ist. Dabei ist es belanglos, ob der Phage vor der Infektion einen UV-Schaden besaß oder nicht; entscheidend ist lediglich, daß der Schaden so „rechtzeitig“ durch WR rekombinativ reaktiviert wird, daß der infizierende Phage noch den prälysogenen Zustand erzeugen und damit die vegetative Phagenentwicklung unterdrücken kann. Unter den entsprechenden physiologischen Bedingungen erscheint mithin auch das

Lysogenisierungsvermögen des geschädigten Phagen durch WR rekombinativ reaktivierbar, so daß die infizierte Zelle noch lysogenisiert werden kann. Das Ausmaß dieser Reaktivierung ist an der Größe von k abzulesen. Es ist nun zu fragen, ob auch der umgekehrte Vorgang, d. h. eine rekombinative Reaktivierung der Lysogenisierbarkeit eines geschädigten Bakteriums durch einen Phagen möglich ist. Es ist nämlich bekannt, daß auch UV-Bestrahlung uninfizierter Bakterien die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit anschließend infizierender Phagen vermindert (LWOFF et al. 1954; BERTANI 1957, 1959; FRY 1959). Dieser Befund zeigt, daß durch den UV-Schaden im Bakterium eine physiologische Leistung des Komplexes verhindert wird — nämlich die Lysogenisierung bzw. die Herstellung des prälysogenen Zustandes —, ganz analog der Folge eines UV-Schadens in Region B des Phagen.

Im folgenden wurde untersucht, ob der Verminderung der *Lysogenisierungshäufigkeit* durch *UV-Bestrahlung des Bakteriums* ein Schaden zugrunde liegt, der umgekehrt durch genetisches Material des Phagen rekombinativ reaktiviert werden kann. — Im Prinzip ist bereits bekannt, daß genetisches Phagenmaterial Strahlenschäden im Bakterium reaktivieren kann (KELLENBERGER et al. 1958). Alle diese Befunde wurden jedoch gewonnen an gemäßigten Wildtyp-Phagen unter alleiniger Auswertung der lytischen Infektionen bei Vernachlässigung der lysogenen oder an Klarplaquemutanten gemäßigter Phagen, die ohnedies nur noch lysieren können. Es besteht indessen kein zwingender Grund für die Annahme, daß eine an der Lysogenisierung beteiligte Aktivität des Bakteriums in dessen Genom liegt und darüber hinaus noch genetischem Phagenmaterial homolog ist. Die Entscheidung der Frage, ob eine solche Homologie besteht, ist auf zwei Wegen möglich. Auf dem ersten, direkten Wege führt man einen Versuch gleich dem von GAREN et al. durch und vergleicht das Überleben der Lysogenisierungen auf unbestrahlten und UV-bestrahlten Bakterien. Da die vor der Infektion vorgenommene, separate Bestrahlung von Bakterien und Phagen die Rekombinationshäufigkeit zwischen Bakterien- und Phagen-DNS bei der intracellulären Phagenentwicklung erhöht, wodurch die sogenannte „UV-Reaktivierung“ zustande kommt (WEIGLE 1953), sollte man bei bestrahlten Bakterien eine absolut höhere Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k erwarten. Ein entsprechender Versuch zeigte jedoch, daß k umgekehrt niedriger lag (Tab. 1, Vers. 72). In diesem Versuch konnten die Bakterien jedoch, um die Lysogenisierungen noch einigermaßen sicher auszählbar zu halten, nur 5 sec mit UV bestrahlt werden; es wäre aber denkbar, daß unter solchen Bedingungen die UV-Reaktivierung noch so niedrig ist, daß sie durch anderweitige, sekundäre Strahleneffekte noch überdeckt ist. Die Ergebnisse von GAREN et al. (1955) lassen nämlich bei der entsprechenden UV-Dosis nur eine

UV-Reaktivierung um den Faktor 1,1 erkennen; ein so geringer Effekt könnte aber leicht durch solche Nebenwirkungen überdeckt werden. Es wurde daher versucht, auf einem zweiten, indirekten Wege die gestellte Frage zu entscheiden.

Falls Phagen mit ihrem genetischen Material das UV-geschädigte Lysogenisierungsvermögen der Bakterien rekombinativ reaktivieren können, müßte — wie im umgekehrten Falle ja bereits nachgewiesen — ebenfalls eine Restlysogenisierung bzw. Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k bei mittleren und hohen UV-Dosen auf die Bakterien nachweisbar sein. Diese Restlysogenisierung müßte — wie im umgekehrten Falle bei bestrahlten Phagen — auf den sogenannten „späten“ Lysogenisierungen (S.184) beruhen, d.h. auf lysogenen Infektionen nach erfolgter Reaktivierung der UV-Schäden. Dies konnte in einem Versuch geprüft werden, bei welchem unbestrahlte Phagen an mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlten Bakterien adsorbiert wurden und dann die Ausbeute an lytischen und lysogenen Infektionen ausgezählt wurde. In Abb. 7 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt; man kann daraus ableiten:

1. Das Koloniebildungsvermögen der bestrahlten Zellen nimmt in einer Mehrtrefferkurve ab.

2. Die Lysogenisierungen sinken bis zu etwa 40 sec UV eintrefferartig ab; bei weiterer Erhöhung der UV-Dosis scheinen sie in die Kurve des Koloniebildungsvermögens einzumünden oder ihr parallel zu verlaufen; der Anteil der Lysogenisierungen ist jedenfalls dann so gering, daß er experimentell nicht mehr zu fassen ist. Ein „Restlysogenisierungsvermögen“, wie es bei UV-bestrahlten Phagen zu beobachten ist, besteht offenbar nicht. — Gleichartige Schlußfolgerungen können aus Versuchen BERTANIS (1957) mit P2-Phagen von *E. coli* abgeleitet werden.

3. Die Infizierbarkeit der Bakterien als Summe aus lytischen + lysogenen Reaktionen ist bis zu 70 sec UV praktisch unverändert. Erst bei weiterer Steigerung der Dosis sinkt die „Kapazität“ der Bakterien (= Reproduktionsfähigkeit für infizierende Phagen), jedoch sind in diesem Bereich überhaupt keine Lysogenisierungen mehr nachweisbar (siehe 2.).

4. Entsprechend der großen UV-Resistenz der lytischen und der starken UV-Empfindlichkeit der lysogenen Infektionsreaktionen bei UV-bestrahlten Bakterien steigen die Lysen bei geringen UV-Dosen etwas an, um dann bei höheren Dosen praktisch mit den Werten der Infektionen zusammen zu fallen.

Drei besonders wesentliche Schlüsse seien aus diesen Ergebnissen hervorgehoben:

a) Koloniebildungs- und Lysogenisierungsvermögen der Bakterien sind offenbar voneinander weitgehend unabhängige Eigenschaften, da sie verschiedene Inaktivierungskinetik aufweisen. Nichtsdestoweniger erscheint ihre UV-Empfindlichkeit überraschend ähnlich.

b) Die Kapazität der Bakterien für lytische Infektionen ist — verglichen mit der für Lysogenisierungen — außerordentlich UV-resistent und wird im Gegensatz zur Lysogenisierungsinaktivierung nach Mehr-trefferkinetik inaktiviert. Es liegen also offenbar auch hier verschiedene,

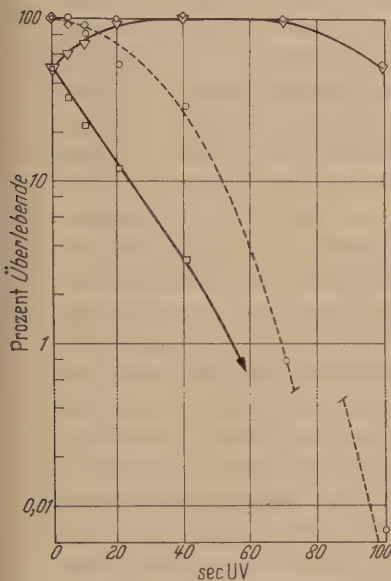


Abb. 7

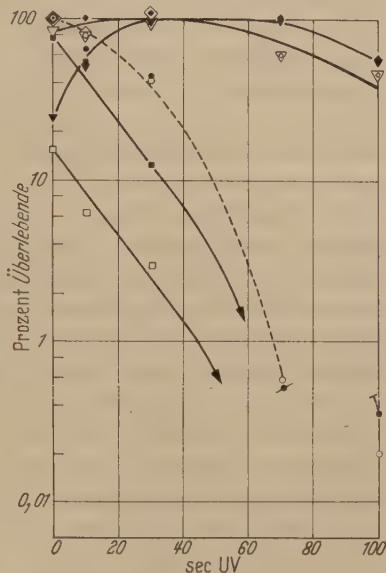


Abb. 8

Abb. 7. Die Inaktivierung der Lysier- und Lysogenisierbarkeit von Try8⁻-Zellen durch UV-Bestrahlung der Zellen vor der Infektion mit unbestrahlten P22. Stationäre Zellen von Try8⁻ wurden nach Waschen und Suspendierung in P-Puffer (etwa $3,5 \cdot 10^8$ /ml) mit UV bestrahlt und anschließend mit unbestrahlten P22 (Multiplizität der Infektion $\leq 0,01$) infiziert: Nach 10 min Adsorption in P-Puffer wurden die freien Phagen durch Verdünnung in Bouillon + Antiserum inaktiviert (4 min; 10^{-3} Überlebende) und die Komplexe zusammen mit Tgal⁻ als Indicator in Weichagar ausgeplattet. In gleicher Weise wurde eine Parallele zur Bestimmung der überlebenden koloniebildenden Bakterien behandelt, bei der statt der Phagensuspension nur Puffer zu den Bakterien gegeben wurde. Nach genügender Bebrütung wurden die Lysen (∇), Lysogenisierungen (\square) und überlebenden Bakterien (\circ) ausgezählt. Die Summe aus Lysen und Lysogenisierungen wurde als Infektionen (\diamond) eingezeichnet. Ausgezogene Kurven: interpolierte Werte der Komplexe; gestrichelte Kurven: interpolierte Werte der uninfizierten Bakterien

Abb. 8. Einfluß von Chloramphenicol auf die Lysier- und Lysogenisierbarkeit UV-bestrahlter Try8⁻-Zellen. Versuchsbedingungen wie im Versuch der Abb. 7, ausgenommen, daß die Inaktivierung der freien Phagen durch Antiserum innerhalb 5 min erfolgte (10^{-3} Überlebende) und daß danach eine Probe für 15 min in Bouillon bei 37° C gehalten wurde [∇] Lysen, [\square] Lysogenisierungen, (\diamond) Infektionen, (\circ) Koloniebildner], die andere in 25 µg/ml Chloramphenicol in Bouillon [∇] Lysen, (\square) Lysogenisierungen, (\diamond) Infektionen, (\bullet) Koloniebildner]. Ausgezogene Kurven: interpolierte Werte der Komplexe; gestrichelte Kurven: interpolierte Werte der uninfizierten Bakterien

durch UV zu schädigende Zellkomponenten vor, hier jedoch mit sehr unterschiedlicher UV-Empfindlichkeit.

c) Die Lysogenisierungsinaktivierung ist eintrefferartig und läßt keine Restlysogenisierung erkennen. Daraus kann geschlossen werden, daß die für eine Lysogenisierung erforderliche Struktur der Zelle nicht durch

genetisches Material des Phagen rekombinativ reaktiviert werden kann. Dieses Ergebnis bleibt auch dann unverändert, wenn man die Komplexe zur Erhöhung der Chance für genetische Rekombinationen zwischen Phagen- und Bakterien-DNS nach der Antiserum-Behandlung für 15 min in Bouillon + CMP bei 37°C bebrütet (Abb. 8). Zwar werden die Lysogenisierungen im CMP-Versuch im Vergleich zur reinen Bouillonbehandlung wesentlich erhöht, jedoch ist keinerlei Anzeichen für eine Restlysogenisierung zu bemerken. (Die Probe in Bouillon zeigt im Vergleich zum Versuch in Abb. 7 geringere Lysogenisierungswerte, was offenbar durch den 15 min längeren Aufenthalt der Komplexe bei 37°C im Wasserbad verursacht wird.)

Die oben gestellte Frage, ob ein UV-Schaden in der für die Lysogenisierung verantwortlichen Struktur des Bakteriums rekombinativ reaktiviert werden kann, muß also verneint werden. Da zwischen den homologen Genomregionen B von Phage und Bakterium auch beim P22 Rekombinationen in „beiden Richtungen“ (GAREN u. ZINDER 1955, Abb. 4) möglich sind, bleiben zwei Interpretationsmöglichkeiten für dieses Ergebnis offen: Entweder liegt die für die Lysogenisierung verantwortliche Struktur der Zelle in ihrem Genom, dann besitzt der Phage keinen ihr homologen Genomanteil, oder die Struktur ist cytoplasmatischer Natur, d.h. sie ist in der einkernigen Zelle (in unseren Versuchen wurden ja stationäre, also einkernige Zellen verwendet) als einzelne, UV-sensible Cytoplasmastruktur vorhanden. In beiden Fällen wird jedoch ihre Funktion 1. durch einen einzigen UV-Schaden zerstört und 2. kann der Phage sie weder rekombinativ noch sonstwie reaktivieren. Formal definiert würde dann die Lysogenisierung eines Bakteriums eine spezifische Leistung zweier uneingeschränkt funktionsfähiger Systeme aus Phage und Bakterium darstellen. Nach den Ergebnissen über die Inaktivierung des Phagen λ in stark mit P^{32} gefütterten Bakterien (STENT u. FUERST 1958) sowie morphologischen Untersuchungen (KELLENBERGER 1959) scheint aber diese Bakterienstruktur der Zellkern zu sein und nicht eine cytoplasmatische Struktur.

Folgerungen aus den Ergebnissen

Die vorliegenden Resultate sollen in erster Linie im Hinblick auf das Verständnis der einer Lysogenisierung vorgelagerten Prozesse im System *Salmonella* — Phage P22 diskutiert werden. Zu diesem Zwecke seien die wesentlichen Ergebnisse noch einmal in drei Punkten zusammengefaßt.

1. Durch UV-Bestrahlung des P22 werden Infektionsvermögen (Lysen + Lysogenisierungen) und Lysogenisierungen allein nach Eintreffeffunktionen vermindert. In Bereichen niedriger UV-Dosen erweist sich das Infektionsvermögen um den Dosisreduktionsfaktor $r = 0,26$ inaktivierungsunempfindlicher als das Lysogenisierungsvermögen. Demgemäß

kann man unterscheiden: a) Schäden in einer 26% der gesamten Phagen-DNS umfassenden Region A, die zu völliger Infektionsunfähigkeit führen, und Schäden in einer Region B (74%), die durch rekombinative Wirtsreaktivierung (WR) mit einer ungeschädigten homologen Region des Bakteriengenoms wieder ausgeglichen werden können. Als Folge dieser WR wird eine eintrefferartige Verminderung der hohen Lysogenisierungswahrscheinlichkeit K ungeschädigter Phagen auf eine niedrigere, nun aber UV-unempfindliche Lysogenisierungswahrscheinlichkeit k (Restlyso-
genisierungswahrscheinlichkeit) beobachtet.

2. UV-geschädigte P22 können nur dann lysogenisieren, wenn der UV-Schaden durch WR so „rechtzeitig“ behoben wird, daß die vegetative Phagenentwicklung noch durch die Herstellung des prälysogenen Zustandes bzw. die Repressorbildung unterdrückt werden kann. Behandlung der Komplexe mit Chloramphenicol erhöht k , offenbar durch eine entsprechende Erhöhung der Chance für eine „rechtzeitige“ WR.

3. Die lysogenen Infektionen des P22 werden durch Bestrahlung der Bakterien vor der Infektion in Eintrefferkinetik zugunsten lytischer Infektionen vermindert, ohne daß ein UV-unempfindliches Restlyso-
genisierungsvermögen zu beobachten ist. Durch die UV-Bestrahlung wird offenbar eine nicht reaktivierbare Struktur des Bakteriums geschädigt, die in Zusammenarbeit mit Region B des Phagen-genoms den Repressor (JACOB, SCHAEFFER u. WOLLMAN 1960) synthetisiert und damit den prälysogenen Zustand herstellt.

Welche Faktoren beeinflussen nun die schließliche Entscheidung des Komplexes für Lyse oder Lysogenisierung? Man weiß aus einer Reihe von Untersuchungen, daß diese Entscheidung unter konstanten genischen Bedingungen von der Multiplizität der Infektion (PRELL et al. 1959) und dem physiologischen Zustand des Komplexes abhängt (LWOFF et al. 1954; BERTANI et al. 1954; BERTANI 1957). Die physiologischen Bedingungen des Komplexes bestimmen dabei offenbar auf Grund eines leicht veränderlichen, metabolisch gesteuerten Systems die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit des einzelnen infizierenden Phagen. Innerhalb einer physiologisch nicht „synchronisierten“ Bakterienpopulation wird sich dann — in Abhängigkeit von dem jeweils unterschiedlichen Zustand der einzelnen Komplexe — vorwiegend die lytische oder die lysogene Reaktionskette durchsetzen. Es ist nun naheliegend, in jeder einzelnen Zelle einen „Wettlauf“ zwischen der für Lyse oder für Lysogenisierung entscheidenden Reaktionskette zu vermuten; den Wettlauf „gewinnt“ diejenige Reaktionskette, die zuerst ein Stadium erreicht, bei dem sie die Entwicklung der konkurrierenden Reaktion unterdrücken kann. Eine derartige Unterdrückung der lytischen Reaktionskette durch die zum prälysogenen Zustand führenden Vorgänge konnte bereits bei der Entstehung des „Multiplizitätseffektes“ (bei erhöhter Multiplizität der Infektion erhöhter

Lysogenisierungsprozentsatz) nachgewiesen werden (PRELL et al. 1959). Diese Unterdrückung war indessen nur innerhalb eines gewissen Bereiches der Latenzzeit möglich; jenseits dieses Zeitraumes, d.h. bei weiter fortgeschrittener lytischer Phagenentwicklung, blieb die Unterdrückung aus. — Mit Hilfe dieses „Wettlaufmodells“ kann also jegliche Veränderung der Lysogenisierungswahrscheinlichkeit eines infizierenden Phagen formal als selektive Förderung oder Hemmung der einen Reaktionskette bzw. einer daraus entstehenden relativen Hemmung oder Förderung der anderen interpretiert werden. Im folgenden soll gezeigt werden, daß das Wettlaufmodell geeignet ist, alle hier dargestellten Befunde befriedigend zu erklären, und daß es weiterhin mit Ergebnissen anderer Autoren über die Physiologie der Phagenentwicklung unmittelbar verknüpft werden kann.

Ein UV-Schaden im Phagen behindert, wie gezeigt werden konnte, die lysogene Phagenentwicklung. *Welche Vorgänge könnten nun dafür verantwortlich sein, daß die lysogene Reaktionskette beim Wettlauf beider Reaktionen zugunsten der lytischen behindert wird?* Voraussetzung für eine intracelluläre Phagenentwicklung des P22 ist ein ungeschädigtes Phagen-genom mit den Regionen A und B; dabei dürfte es belanglos sein, ob dieses Genom bereits ungeschädigt in die Wirtszelle injiziert wurde oder nach vorausgegangener Schädigung erst in der Zelle durch Rekombinationsprozesse (z.B. Wirtsreaktivierung, Mehrfachreaktivierung; PRELL 1960) reaktiviert wurde. Bei Einzelinfektion eines Bakteriums mit einem UV⁺-geschädigten P22, d.h. bei Ausschaltung einer Rekombination zwischen mehreren infizierenden Phagen, erweist sich, wie aus unseren Versuchen abzuleiten war, ein Schaden in Region A unter allen Umständen als letal, da das Bakteriengenom kein homologes genisches Material für eine WR enthält. Ein Schaden in Region B kann jedoch durch WR behoben werden, und zwar mit 100% Wahrscheinlichkeit unter der Annahme, daß Region B etwa $\frac{3}{4}$ des gesamten Phagen-Genoms ausmacht. Dabei ist die Effektivität der WR, gemessen an der Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit k , im untersuchten Dosisbereich unabhängig von der Zahl der UV-Schäden in Region B. Trotz dieser UV-Schäden tritt also keine Inaktivierung der Phagenentwicklung ein. Vielmehr kann man lytische und lysogene Phagenentwicklung beobachten, jedoch mit quantitativen Veränderungen. Die lytische ist wegen des notwendigen Reaktivierungsprozesses durch eine verlängerte Latenzzeit gekennzeichnet (GAREN et al.) und tritt mit größerer Häufigkeit auf. Die lysogene Infektion ereignet sich seltener, und zwar statt mit der hohen Wahrscheinlichkeit K nur noch mit der verminderten k (Abb. 2); Die so „verlorenen“ Lysogenisierungen ergeben also lytische Infektionen. *Ein UV-Schaden in Region B verschiebt mithin das Gleichgewicht zwischen lytischen und lysogenen Reaktionen zugunsten ersterer.* Offenbar

schränkt die rekombinative Wirtsreaktivierung der Region B die Wahrscheinlichkeit für eine lysogene Reaktion ein und erhöht damit die für eine lytische.

Unter den verschiedenen sich anbietenden Erklärungsmöglichkeiten soll hier nur diejenige diskutiert werden, die alle Beobachtungen widerspruchsfrei zu erklären vermag: Offenbar können während der Reaktivierung der Region B bereits andere, von der ungeschädigten Region A in Gang gesetzte Reaktionsketten zu physiologischen Bedingungen führen, unter denen bei überwiegender Mehrzahl der Komplexe nach schließlich vollendeter Reaktivierung der Region B des Phagen keine Lysogenisierung mehr möglich ist bzw. die lysogenen Reaktionen unterdrückt werden.

In einer Population von Komplexen würde bei zunehmender UV-Dosis gemäß der exponentiellen Abnahme des Anteils völlig ungeschädigter Phagen eine exponentielle Verminderung der Lysogenisierungshäufigkeit zu erwarten sein; dies wurde auch beobachtet (Abb. 2). Bei hohen Dosen sollte man dann, wie sich ebenfalls bestätigen ließ, in den Bereich der UV-resistenten, aber geringen Restlysogenisierungshäufigkeit k (Abb. 2) gelangen. Diese Restlysogenisierungen rühren von Komplexen her, welche trotz der Notwendigkeit einer WR ihrer Phagenschäden noch den prälysogenen Zustand erreichen konnten. Da letzterer aber auch vom physiologischen Zustand beeinflußt wird, sollte auch erwartet werden, daß unter verschiedenen physiologischen Bedingungen der Anteil der Komplexe mit Restlysogenisierungen wechselt. Die in Tab. 1 zusammengestellten Versuchsergebnisse bestätigen dies.

Welche physiologischen Prozesse verhindern nun die Etablierung des prälysogenen Zustandes und führen damit zur Lyse des infizierten Bakteriums? Die Beantwortung dieser Frage wird natürlich für ungeschädigte und geschädigte Phagen gleichermaßen gelten; denn auch an nicht geschädigten Phagen kann durch Variation der physiologischen Bedingungen des Komplexes der Anteil der Lysogenisierungen herabgesetzt werden. Der Zeitpunkt, zu dem eine endgültige Determinierung der lytischen Reaktion erreicht werden kann, liegt mit Sicherheit nicht innerhalb der ersten 5 min nach Übertragung der Komplexe in Bouillon; denn auch noch nach dieser Zeit kann z. B. durch CMP die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit noch erhöht werden (BERTANI 1957). Die mit ihr verbundene Verminderung lytischer Reaktionen zeigt darüber hinaus, daß die endgültige Determinierung der Lyse offenbar eine ungestörte Proteinsynthese voraussetzt. Dabei handelt es sich natürlich nicht um jene innerhalb 2—3 min nach erfolgter Infektion ablaufende „frühe“ Proteinsynthese (TOMIZAWA et al. 1956); denn bei ihrer Blockierung bleibt ja jegliche Phagenentwicklung aus, also auch die lysogene. Vielmehr scheint es sich um die „spätere“, mit der Phagenreifung in Zusammenhang stehende

Proteinsynthese zu handeln. HERSHEY u. MELECHEN (1957) sowie KELLENBERGER, SÉCHAUD u. RYTER (1959) konnten nämlich nachweisen, daß CMP die Bildung des „condensing principle“ sowie des Phagenhüllproteins verhindert und dadurch offenbar die Phagenreifung blockiert. Von der Hemmung der „späten“ Proteinsynthese wird also die zur Lyse führende Reaktionskette selektiv betroffen, wodurch die lysogene einen relativen Vorteil gewinnt. Durch UV-Schäden in Region B wird also jener die Lyso-genisierung verhindernde, von der ungeschädigten Region A gesteuerte physiologische Zustand relativ „früher“ erreicht, d. h. früher im Vergleich mit den Reaktionsketten, die durch Region B gesteuert werden und infolge der vorausgehenden WR erst stark verspätet anlaufen können. Dieser bevorzugte Reaktionsablauf zur endgültigen Determinierung der lytischen Phagenentwicklung stellt offenbar jenen durch UV-Schädigung erzeugten „Vorteil“ der lytischen Reaktionskette im „Wettlauf“ mit der lysogenen dar. CMP würde nach diesem Bild umgekehrt durch Blockierung der Proteinsynthese die lytischen Reaktionsketten selektiv hemmen. Diesem Wettlauf kann natürlich noch eine Latenzzeitverlängerung überlagert sein (GAREN et al. 1955), ohne daß letztere in direktem kausalen Zusammenhang mit der UV-induzierten Vergrößerung der Wahrscheinlichkeit für lytische Phagenentwicklung stehen müßte. Für die Entscheidung über den Ausgang jenes Wettlaufes der beiden Reaktionsketten ist lediglich der Unterschied ihrer Geschwindigkeiten maßgebend.

Welche weiteren Argumente lassen sich dafür anführen, daß sowohl Veränderungen der physiologischen Bedingungen des Komplexes als auch UV-Schäden im Phagen genom den „Wettlauf“ in der geschilderten Weise beeinflussen? Diese Argumente können gleichzeitig als weitere generelle *Unterstützung der „Wettlaufhypothese“* gewertet werden.

1. Die Beobachtung von TOMIZAWA et al. (1956), daß in Gegenwart von CMP DNS synthetisiert werden kann, wurde von HERSHEY et al. (1958) auch für den Ablauf genetischer Rekombinationen erweitert: Der relative Ertrag an Rekombinanten bei der Kreuzung zweier T4-Mutanten ist in Versuchsparallelen jeweils mit oder ohne vorausgegangene CMP-Behandlung völlig gleich; dies gilt auch, wenn die Rekombinationshäufigkeit durch UV-Bestrahlung der freien Phagen erhöht worden war. Daraus geht hervor, daß CMP den Ablauf genetischer Rekombinationen nicht beeinflusst, d. h. also je gebildetes Phagenpartikel weder fördert noch hemmt. — Prinzipiell gleiche Schlüsse lassen sich aus Untersuchungen von THOMAS (1959) am Phagen λ ableiten.

2. In Gegenwart von CMP laufen die DNS-Vermehrung und die genetischen Rekombinationen ungestört ab, während zur Lyse führende Reaktionen blockiert werden (siehe 1.). Daraus resultiert zunächst bei *ungeschädigten Phagen* ein mit der Behandlungsdauer zunehmender

Vorteil für die die Lysogenisierung herbeiführenden Reaktionsketten und damit eine Erhöhung der Lysogenisierungswahrscheinlichkeit (BERTANI 1957; CHRISTENSEN 1957; Tab.3, Spalte 1 und 2). Die CMP-Behandlung sollte jedoch in Komplexen mit *UV-geschädigten Phagen* die Lysogenisierungschance relativ noch viel stärker erhöhen, da sich der bereits bei unbestrahlten Phagen beobachteten relativen Förderung der lysogenen Reaktionen durch CMP noch die Erhöhung der Lysogenisierungschance durch die „rechtzeitige“ WR der UV-Schäden zuaddiert, d.h. die WR im „Schutze“ der die lytischen Reaktionsketten selektiv hemmenden CMP-Wirkung. Auch dieser Effekt, der natürlich der Behandlungsdauer proportional sein muß, wird beobachtet (Tab.3, Spalte 3).

3. Eine Blockierung der Proteinsynthese durch Aminosäureanaloga oder durch Aminosäurehunger aminosäurebedürftiger Mutanten führt zu einer Erhöhung der Lysogenisierungschance (BERTANI 1957); dies muß auch erwartet werden, weil dadurch die zur Entscheidung für Lyse führende, mit der „späten“ Proteinsynthese verknüpfte Reaktionskette selektiv gehemmt wird.

4. Sogar UV-Bestrahlung von Komplexen kann zu einer Erhöhung lysogener Reaktionen führen, wenn sie gerade zu dem Zeitpunkt erfolgt (Ende erstes Drittel der Latenzzeit), an welchem möglicherweise die genetische Information der Phagen-DNS oder auch eine spezifische RNS für die Bildung der Phagenhüllproteine oder anderer an der Reifung beteiligter Proteine benötigt wird (BERTANI 1959).

Die zur Lyse und zur Lysogenisierung führenden Reaktionsketten nach Infektion einer Zelle durch P22 können auf Grund der hier dargestellten Befunde und den daraus möglichen Schlüssen in folgendem *hypothetischen Reaktionsablauf* zusammengefaßt werden:

Nach Injektion eines ungeschädigten und damit uneingeschränkt funktionsfähigen Phagen-genoms wird innerhalb eines vegetativen „Phagen-pools“ die Phagen-DNS vermehrt. Im Gegensatz zum virulenten *Coli*-Phagen T2, bei dem der pool nach der raschen Zerstörung der Nucleoide morphologisch im Cytoplasma lokalisiert werden kann (KELLENBERGER et al. 1959), soll hier als pool nur eine funktionelle Einheit bezeichnet werden, in welcher genetische Rekombination und Phagen-

Tabelle 3. *Relative Erhöhung der Lysogenisierungswahrscheinlichkeiten durch Chloramphenicolbehandlung ungeschädigter und UV-geschädigter P22*
(Umrechnung der Werte der Tab.2)

Zeit der CMP ¹ Behandlung (min)	Ohne UV Faktor der Er- höhung von K durch CMP ¹ Behandlung	70 sec UV Faktor der Er- höhung von k durch CMP ¹ Behandlung
5	1,65	2,63
10	2,12	6,37
15	2,57	13,20

¹ CMP = Chloramphenicol, 25 µg/ml in Bouillon; Bedingungen wie in Tab.2.

DNS-Vermehrung stattfinden. Bei der Blockierung der Proteinsynthese (z. B. durch CMP) werden die zur Lyse führenden Reaktionsketten selektiv behindert, die zur Lysogenisierung führenden jedoch nicht, so daß die Wahrscheinlichkeit für die Erreichung des prälysogenen Zustandes bzw. die Repressorbildung durch Zusammenarbeit einer Zellkomponente mit Region B des Phagen erhöht wird. Enthält das injizierte Phagengenom jedoch UV-Schäden, so kann eine DNS-Synthese erst dann einsetzen, wenn durch eine „early cooperative action“ (NUTTER u. SINSHEIMER 1959) der geschädigten Phagen die entsprechenden Bedingungen dafür hergestellt sind. Dies kann durch rekombinative Reaktivierung durch den Wirt (WR; Region B) oder durch andere, gleichzeitig infizierende Phagen (MR; Region A und B) geschehen. Solange nun während der DNS-Vermehrung noch keine durch die Region A gesteuerten, von einer Proteinsynthese abhängigen „Reifungsvorgänge“ eingeleitet sind, kann der prälysogene Zustand jederzeit hergestellt werden. Dieser Zustand entsteht durch die Bildung des Repressors, jedoch jeweils nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, die von physiologischen Bedingungen abhängt. Der Repressor selbst wird offenbar durch Zusammenwirkung der Region B des Phagengenoms und einer eintrefferartig UV-inaktivierbaren Struktur des Bakterienwirtes gebildet; diese Bakterienstruktur kann nach einer UV-Schädigung nicht durch den Phagen reaktiviert werden. Der Repressor unterdrückt seinerseits dann jede weitere Entwicklung im Phagenpool sowie die Reifung der Phagen. — Über die chemische Natur des Repressors geben unsere Experimente keine Auskunft; seine Bildung oder zumindest eine wesentliche Voraussetzung für sie scheint jedoch auch bei blockierter Proteinsynthese möglich. Damit kann der Repressor der lytischen Phagenentwicklung offenbar unter gleichen physiologischen Bedingungen gebildet werden wie der Repressor der konstitutiven Enzyymbildung in einem Bakterium mit adaptivem (= induzierbarem) Enzyymbildungsvermögen (PARDEE u. PRESTIGDE 1959). — Mit der Erreichung des prälysogenen Zustandes ist der Ablauf der lysogenen Reaktionskette endgültig determiniert; sie kann zur stabilen Lysogenisierung (lysogene Zelle) oder abortiven Lysogenisierung (Phagenverlust, alysogene Zelle) führen.

Ist jedoch die vegetative Phagenentwicklung bereits sehr weit fortgeschritten, d.h. sind die durch Region A gesteuerten „Reifungsschritte“ bereits eingeleitet, so ist damit offenbar die Lyse endgültig determiniert; denn die Repressorwirkung bleibt aus („Antirepressionsreaktion“) und es kann keine Lysogenisierung mehr eintreten. Ob die Antirepressionsreaktion auf einer Verhinderung der Repressorsynthese oder auf einer Unwirksamkeit des normal gebildeten Repressors unter dem nun veränderten physiologischen Zustand beruht, ist nicht zu entscheiden.

Die Wirkung des CMP auf die beiden konkurrierenden Reaktionen wäre dann folgende: Bei ungeschädigten Phagen wird die Proteinsynthese für die Phagenreifung bzw. die „Antirepressionsreaktion“ selektiv behindert; dadurch bleibt die vegetative Phagenentwicklung länger im repressionsempfindlichen Stadium. Demzufolge steigt mit zunehmender Dauer der CMP-Einwirkung natürlich die Wahrscheinlichkeit für die Herstellung des prälysogenen Zustandes bzw. die Repression der vegetativen Phagenentwicklung. Bei UV-geschädigten Phagen addiert sich zu diesem Effekt noch die Möglichkeit, im „Schutze“ der CMP-Einwirkung die Schäden der Region B „genügend früh“ zu reaktivieren, so daß auch die reaktivierte Region B eine höhere Chance für die Bildung des Repressors erhält. — Offenbar erst bei endgültiger Determinierung der möglichen Entwicklungsrichtungen trennen sich die beiden, anfangs nebeneinander laufenden Reaktionsketten in die zwei verschiedenen, zur Lyse oder Lysogenisierung führenden Äste. Diese Interpretation steht in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von STENT et al. (1956) an P³²-markierten λ -Phagen.

Ist die für die Lysogenisierung verantwortliche Struktur der Bakterienzelle indessen UV-geschädigt, dann kann es überhaupt nicht zu jenem Wettlauf zwischen den beiden Reaktionsketten kommen; denn die an der Entscheidung für Lysogenisierung bzw. an der Repressorbildung beteiligte Bakterienstruktur ist ja irreparabel funktionsunfähig, so daß nur noch die zur Entscheidung für Lyse führende Reaktionskette ablaufen kann.

Summary

Ultraviolet irradiation of the temperate phage P 22 inactivates the over all infections (sum of lytic + lysogenic responses) as well as the lysogenic response alone according to a one hit kinetics. With stationary cells the inactivation kinetics of the infections shows the first order reaction character only after correction of the countable infections for abortive lysogenizations which can be estimated graphically. The inactivation of the lysogenic response shows always one hit kinetics regardless of abortive lysogenisations which seem to constitute, depending on physiological conditions of the complex, a constant portion of the lysogenic responses.

At low doses of ultraviolet irradiation the lysogenic response is nearly four times more sensitive to inactivation than the overall infective response; at high doses however, both responses show the same sensitivity (Fig. 1). This means that in the average each ultraviolet hit on a phage particle decreases its probability for lysogenization from a high value (K) to a low one (k) and in the average every forth hit inactivates it completely. But in contrast to K , k seems to be ultraviolet resistant, therefore k is called

“residual probability of lysogenization” (= “Restlysogenisierungswahrscheinlichkeit”). Therefore, the frequency of lysogenization among surviving infections decreases at low ultraviolet doses and remains constant at high ones (Fig. 2).

Further analysis shows that about 25% of the ultraviolet damage in the genom of P22 is in a DNA-region A and 75% in a region B. Ultraviolet lesions in region B can be reactivated by host material (host reactivation by region B of the bacterial genom), but the probability for lysogenic response is decreased by such hit effects from the high value of K (undamaged region B) to the low value k (damaged region B); the difference between K and k depends on physiological conditions. — Ultraviolet lesions in region A are always lethal. — Treatment of complexes with chloramphenicol (CMP) 5 min after infection increases k much more than K ; both probabilities increase with the duration of CMP-treatment. — Ultraviolet irradiation of the host bacterium prior to infection decreases the frequency of lysogenization according to a one hit kinetics. For the synthesis of the repressor of lytic phage development and the establishment of lysogenization there seems to be necessary some kind of “cooperation” between the region B of the phage genom and a special UV-sensitive structure of the cell. Since experiments with UV-ed bacteria + unirradiated phages showed no “residual probability of lysogenization” (Fig. 7), no reactivation seems to happen due to recombination between region B of the phage and the UV-damaged cell structure in contrary to the known “host reactivation” of Lytic responses due to recombination between homologous regions of both the phage and the bacterial genom.

A model is proposed for the process of lysogenization which explains all observed facts as a phenomenon of competition between “lytic” and “lysogenic” reaction chains leading to decision for lysis or lysogenization: Ultraviolet irradiation favours the lytic response because in most complexes the ultraviolet lesions in region B are reactivated only after decision for lysis directed by the undamaged region A. Short treatment with CMP favours the lysogenic response by halting the decision for lysis, which thus increases (1) the probability for reactivation of damages in region B before removal of the antibiotic and (2) increases the probability for the “cooperation” between region B of the phage and the special UV-sensitive structure of the cell resulting in the synthesis of the repressor. The decision for lysogenization (i.e. the synthesis of the repressor) is independent of protein synthesis, whereas the decision for lysis is dependent of it.

Frau Dr. H. PRELL danke ich besonders für viele anregende Diskussionen und wertvolle Kritik. — Die Ausführung der Versuche wurde in dankenswerter Weise unterstützt durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie die technische Assistenz von Fräulen M.-E. VON KOTZEBUE.

Literatur

- BERTANI, G., and S. J. NICE: Studies on lysogenesis. II. The effect of temperature on the lysogenization of *Shigella dysenteriae* with phage P1. *J. Bact.* **67**, 202 to 209 (1954).
- BERTANI, E. L.: The effect of inhibition of protein synthesis on the establishment of lysogeny. *Virology* **4**, 53—71 (1957).
- BERTANI, E. L.: The effect of ultraviolet light on the establishment of lysogeny. *Virology* **7**, 92—111 (1959).
- CHRISTENSEN, I. R.: Effect of chloramphenicol on lysogenization by temperate phage P1. *Virology* **4**, 184—185 (1957).
- FRY, B. A.: Conditions for the infection of *Escherichia coli* with lambda phage and for the establishment of lysogeny. *J. gen. Microbiol.* **21**, 676—684 (1959).
- GAREN, A., and N. D. ZINDER: Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host bacteria. *Virology* **1**, 347—376 (1955).
- HERSHEY, A. D., E. BURGT and G. STREISINGER: Genetic recombination between phages in the presence of chloramphenicol. *Virology* **6**, 287—288 (1958).
- HERSHEY, A. D., and N. E. MELECHEN: Synthesis of phage-precursor nucleic acid in the presence of chloramphenicol. *Virology* **3**, 207—236 (1957).
- JACOB, F., P. SCHAEFFER and E. L. WOLLMAN: Episomic elements in bacteria. In: *Microbial genetics*. X. Symp. Soc. gen. Microbiol., ed. by W. HAYES and R. C. CLOWES. p. 67—91. Cambridge: The University Press 1960.
- KAISER, A. D.: Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*. *Virology* **3**, 42—61 (1957).
- KELLENBERGER, E.: Growth of bacteriophage. In: *Virus growth and variation*. IX. Symp. Soc. gen. Microbiol. p. 11—32. Cambridge: The University Press 1959.
- KELLENBERGER, G., W. ARBER u. E. KELLENBERGER: Eigenschaften uv-bestrahlter λ -Phagen. *Z. Naturforsch.* **14b**, 615—629 (1959).
- KELLENBERGER, E., J. SÉCHAUD and A. RYTER: Electron microscopical studies of phage multiplication. IV. The establishment of the DNA pool of vegetative phage and the maturation of phage particles. *Virology* **8**, 478—498 (1959).
- KELLENBERGER, G., et J. WEIGLE: Étude au moyen des rayons ultraviolets de l'interaction entre bactériophage tempéré et bactérie hôte. *Biochim. biophys. Acta* **30**, 112—124 (1958).
- LEVINE, M.: Mutations in the temperate bacteriophage P22 and lysogeny in *Salmonella*. *Virology* **3**, 22—41 (1957).
- LIEB, M.: The establishment of lysogeny in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **65**, 642—651 (1953).
- LURIA, S. E., D. K. FRASER, J. N. ADAMS and J. W. BURROUS: Lysogenization, transduction, and genetic recombination in bacteria. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **23**, 71—82 (1958).
- LWOFF, A., A. S. KAPLAN et E. RITZ: Recherches sur la lysogénisation de *Salmonella typhi-murium*. *Ann. Inst. Pasteur* **86**, 127—148 (1954).
- NUTTER, R. L., and R. L. SINSHEIMER: Studies upon DNA-synthesis during multiplicity reactivation of T_2r^+ bacteriophage. *Virology* **7**, 276—290 (1959).
- PARDEE, A. B. and L. S. PRESTIDGE: On the nature of the repressor of β -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. biophys. Acta* **36**, 545—547 (1959).
- PRELL, H. H., u. H. H. M. PRELL: Einfluß der Infektionsmultiplizität auf die Lysogenisierung im System *Salmonella typhimurium*-Phage P 22. *Arch. Mikrobiol.* **34**, 211—232 (1959).

- PRELL, H. H.: Über die Mehrfachreaktivierung des Infektions- und Lysogenisierungsvermögens des Phagen P22 von *Salmonella typhimurium* nach UV-Bestrahlung. *Arch. Mikrobiol.* **35**, 384—390 (1960).
- STENT, G. S.: Mating in the reproduction of bacterial viruses. *Advanc. Virus Res.* **5**, 95—149 (1958).
- STENT, G. S., and C. R. FURST: Decay of incorporated radioactive phosphorus during development of a temperate bacteriophage. *Virology* **2**, 737—752 (1956).
- THOMAS, R.: Effects of chloramphenicol on genetic replication in bacteriophage λ . *Virology* **9**, 275—289 (1959).
- TOMIZAWA, J.-I.: Sensitivity of phage precursor nucleic acid, synthesized in the presence of chloramphenicol, to ultraviolet irradiation. *Virology* **6**, 58—80 (1958).
- TOMIZAWA, J.-I., and S. SUNAKAWA: The effect of chloramphenicol on deoxyribonucleic acid synthesis and the development of resistance to ultraviolet irradiation in *E. coli* infected with bacteriophage T2. *J. gen. Physiol.* **39**, 553—565 (1956).
- WEIGLE, J. J.: Induction of mutations in a bacterial virus. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **39**, 628—636 (1953).

Lehrstuhl für Geologie und Lagerstättenkunde der Technischen Universität Sopron
und Bodenbiologisches Laboratorium der Ungarischen Akademie der Wissen-
schaften Sopron (Ungarn)

Die Verwendung der Spektrochemie zur Bestimmung der Zusammensetzung von Bakterien*

Von

F. MACHER und E. MANNINGER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. August 1960)

Schon seit langem beschäftigen sich die Forscher mit den Inhaltsstoffen und der Chemie der Bakterienzellen. Heute wissen wir schon, daß sich die Zusammensetzung nicht nur nach Arten, sondern mehr oder weniger auch nach Stämmen der Bakterien ändert. Dies hängt hauptsächlich von dem Milieu ab (in erster Linie von der Zusammensetzung des Nährbodens, von dessen Alkalität, von der Temperatur der Züchtung usw.), in welchem die Bakterien wachsen. Darum waren wir stets bestrebt, unsere Versuche in einer möglichst exakt definierten Umgebung (Nährboden, Temperatur und Zeit der Bebrütung) durchzuführen.

Versuche über die Zusammensetzung der Bakterienzellen wurden bis jetzt hauptsächlich mit pathogenen Bakterien durchgeführt. Unser Ziel war ein doppeltes: wir wollten zuerst die Möglichkeit untersuchen, ob die Spektrochemie, welche in den technischen Untersuchungsverfahren schon weit verbreitet und bewährt ist, auch in der Mikrobiologie zur Bestimmung der anorganischen Bestandteile der Bakterien statt den bisher gebräuchlichen Verfahren anwendbar ist, zweitens wollten wir die chemische Zusammensetzung einer bisher nicht bekannten saprophytischen Bakterienart bestimmen.

Wir möchten bemerken, daß in der Mikrobiologie schon einige uns bekannte Versuche unternommen wurden zur Verwendung dieser Methode. TÖRÖK u. SZAKÁCS (1953) benutzten dieses Verfahren zur Bestimmung von Cu-Spuren in Penicillin-Nährboden, und unter anderem (BAUTZ u. HAGEN 1954; BUKATSCH, SCHRICKER u. POSCHENRIEDER 1956; KOCH u. DEDIC 1957a) zum Nachweis für den Spurenelementgehalt der Conidien von einigen Schimmelpilzen.

Das Prinzip der Spektrochemie ist die Beobachtung, daß die Dämpfe der verschiedenen Materien in glühendem Zustand ein Linienspektrum gebendes Licht ausstrahlen, welches nach Zerlegung durch ein geeignetes Mittel im sichtbaren Gebiet mit dem Auge, im ultravioletten Teil mit

* In Kurzfassung wurde diese Arbeit auf dem Kongreß der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft im Oktober 1957 in Budapest vorgetragen.

der photographischen Platte beobachtet werden kann. Das Verdampfen können wir so auf thermischem Wege (Flammenanregung) wie auch auf elektrischem Wege (Bogen, Funkenanregung usw.) erreichen.

Die qualitative Analyse beruht daher auf der Bestimmung der Wellenlängen der einzelnen Linien. Das Prinzip der quantitativen Analyse ist die Beobachtung, daß die Schwärzung gewisser Linien — im linearen Teil der Schwärzungskurve — mit dem Logarithmus der Konzentration proportional ist.

Die spektrochemische Analyse besteht daher aus drei Stufen: 1. Die Herstellung von glühenden Dämpfen, d. h. die Anregung. 2. Die Zerlegung des ausgestrahlten Lichtes in ein Spektrum, welches mit Spektroskopen oder Spektrographen geschehen kann. 3. Die Auswertung des Spektrums.

Die Bestimmung der Zusammensetzung von einzelnen Bakterien hat nicht nur theoretische Bedeutung, sondern findet auch praktische Anwendung, da man bei Kenntnis der elementaren Zusammensetzung der fraglichen Bakterien für sie den optimalen synthetischen Nährboden zusammenstellen kann.

Auf die Spurenelemente, bzw. auf deren Wichtigkeit bei biologischen und biochemischen Untersuchungen haben unter anderen schon KOCH u. DEDIC (1957b) hingewiesen. Nach den Untersuchungen von REISENAUER (1960) ist von den Spurenelementen besonders Co für die B₁₂-Vitaminerzeugung der Mikroorganismen wichtig. BERTRAND u. WOLF (1960) haben die Wichtigkeit von Zn für die Tyrosin-Synthese von *Aspergillus niger* hervorgehoben. Auch GORBACH u. KOCH (1955) haben die wachstumsfördernde Wirkung auf die Mikroorganismen und den Einfluß auf die Fermentation desselben Elementes festgestellt. GORBACH, TERRANOVA u. TERRANOVA (1957a und 1957b) berichten von ihren Versuchen mit den Spurenelementen Cu, Mn und Zn, nach denen diese Spurenelemente auf das Wachstum und auf die Saccharasebildung von *Aspergillus niger* von Einfluß sind.

Diese einzelnen, herausgegriffenen Beispiele aus neuerer Literatur beweisen auch die bedeutende Rolle der Spurenelemente in der Physiologie der Mikroorganismen und die Notwendigkeit dieser Forschungen.

Methode

Zur chemischen Bestimmung der Bakterienzellen benötigt man eine große Menge Bakterien. CRAMER (1891), NICOLLE u. ALILAIRE (1909), sowie andere haben auf festem Nährboden bebrütete Kulturen von deren Oberfläche behutsam heruntergenommen und sammelten auf diese Weise die benötigte Menge zu ihren Untersuchungen. Auch wir haben bei Vorversuchen diese Methode verwendet. Im weiteren aber — sowie bei den Hauptversuchen — haben wir die zu untersuchenden Bakterien aus später noch zu erklärenden Gründen nicht von festem Nährboden heruntergenommen, sondern haben die Kulturen in flüssigem Nährboden gezüchtet und zentrifugiert. Zur Bestimmung des Wassergehaltes, der Trockensubstanz, der organischen und anorganischen Substanzen führen wir in der üblichen Weise fort.

Der trockene Materienteil der Bakterienzellen besteht aus zwei Komponenten, den brennbaren (organischen) und den unbrennbaren (anorganischen). Bei den einzelnen Bakterienarten ist nicht nur der Wassergehalt sondern auch die

Zusammensetzung des trockenen Materials veränderlich und hängt innerhalb einer Art nach CRAMER von den Bebrütungsverhältnissen (d. h. von der Zusammensetzung des Nährbodens, der Temperatur, der Züchtung, dem Alter der Kulturen) ab. Darum haben wir unsere Kulturen unter ganz gleichen Bedingungen eine bestimmte Zeit lang bebrütet.

Die trockene Substanz haben wir im elektrischen Ofen bei 600—700° C geglüht. Das Glühen haben wir darum mit großer Sorgfalt bei niedrigerer Temperatur vollzogen, um die etwaigen flüchtigeren Komponenten nicht zu verlieren. Vom Rückstand wurden die spektrographischen Untersuchungen wie folgt gemacht: 30 mg wurden auf einer Mikrowaage abgewogen und sodann mit ebenfalls 30 mg spektralreinem Kohlenpulver in einer Achat-schale 15 min lang energisch durchgemischt und in eine Lochelektrode gestopft. Das Probematerial entnehmen wir der Mitte der Probe um so etwaige Verunreinigungen aus den Tiegel zu vermeiden. Die Form der verwendeten Lochelektrode zeigt Abb. 1. Die Formung vollzogen wir mit einem eigens hierfür konstruierten Fräser (MACHER 1956). Die Anregung erfolgte mit 220 V, 10 A Gleichstrom-Abreibbogen nach MACHER (1955). Die Probe war der negative Pol. Die Brenndauer des Bogens zur Abkühlung hatte ein Verhältnis von 16:1. Um das Bild der glühenden Elektroden auszublenzen, benutzten wir die Zwischenabbildung mit einer Spalthöhe von 3,2 mm. Das Bild der glühenden Elektroden fiel bei dieser Anordnung auf die Blende. Der Elektrodenabstand betrug 2 mm. Die Einstellung der Elektroden in die optische Achse erfolgte beim ISP-22 Spektrographen mit einer eigens hierfür geschaffenen Einrichtung (MACHER 1958). Die Spaltbreite des Spektrographen wählten wir zu 0,005 mm. Wir arbeiteten mit 9 × 24 cm Gevaert-Scienzia Platten, welche in einem hart arbeitenden Methol-Hydrochinon Entwickler 3 min lang entwickelt wurden. Die Auswertung der fertigen Platten geschah mit den Zeiss SP-2 Projektor.

Da wir in beiden Fällen genau die gleiche Probemenge eingewogen haben und auch alle anderen Bedingungen konstant hielten, so können wir auch einige Schlüsse über die quantitative Zusammensetzung der beiden Bakterien ziehen.

Experimente und Besprechung der Ergebnisse

Zuerst verfolgten wir das Ziel, solche Bakterienarten auszuwählen, welche in großer Menge verhältnismäßig leicht zu züchten sind. Wir untersuchten von diesem Standpunkte aus die stäbchenartige Bakterienart *Azotomonas insolita*, welche auf Agar-Agar-Nährboden eine farblose Kultur vom Typ M gibt und *Sarcina citrea*, welche auf festem Nährboden S-artige gelbe Kolonien und kugelige Zellen bildet.

Die Hauptbestandteile unseres festen Nährbodens (Bohnenagar), welchen wir am Anfang unserer Versuche verwendeten, bestand aus pflanzlichen Materienresten. Deren Zusammensetzung ist einerseits nicht ganz genau bekannt, andererseits ändert sich auch ihre Zusammensetzung von Fall zu Fall. Darum benutzten wir zu unseren weiteren Versuchen synthetischen Nährboden (Nährlösung), welchen

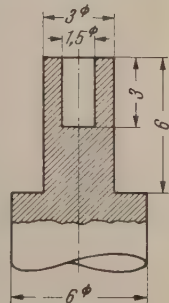


Abb. 1
Form der Elektrode

wir aus gut definierten chemischen Verbindungen zusammenstellten. Dadurch können unsere Versuche, wann immer nötig, eindeutig wiederholt werden und weiter konnten wir dadurch auch verhältnismäßig leicht beurteilen, welche Nährstoffe unsere Kulturen aus ihrer Umwelt aufnehmen.

Wir benützten hierzu die von DOX u. CZAPEK beschriebene Nährlösung mit einigen Änderungen in folgender Zusammenstellung: 30 g Saccharose p.u.sc.; 2 g Na NO₃ p.a.; 1 g KH₂PO₄ p.a.; 0,4 g Mg SO₄ · 7 H₂O p.a.; 0,4 g KCl p.a.; 0,01 g Fe SO₄ · 7 H₂O p.a.; 1000 ml bidestilliertes Wasser; p_H = 7,2 vor der Sterilisation. Die Saccharose gaben wir zu der vorher sterilisierten Lösung erst nach Entkeimung durch ein Seitz-Filter.

Die Nährlösung probierten wir auch auf zweierlei Weisen aus: in eiweißhaltigem und eiweißlosem, bzw. in aminosäurelosem Zustand (im ersten Falle gaben wir 3 g Asparagin zu 1000 ml Wasser). Da sich die Bakterien so in dem Asparagin enthaltenden flüssigen Nährboden, wie auch in dem ohne organische Stickstoffquelle fast gleich gut vermehrten, benützten wir daher zur Gewinnung der großen Bakterienmenge den nach DOX-CZAPEK geänderten asparaginlosen Nährboden.

Die Kulturen legten wir zwecks guter Sauerstoffversorgung 3 Tage lang auf eine waagerechte Schüttelbank bei 27–30° C.

Tabelle 1

Der Wassergehalt, der organische und anorganische Gehalt von Bakterien in Prozenten, gezüchtet auf einem nach Dox u. Czapek geänderten synthetischen Nährboden

Bakterienart	Wassergehalt	Trockene Substanz	Organische Substanz	Anorganische Substanz
	Frisches Gewicht in Prozent		Trockene Substanz in Prozent	
<i>Azotomonas insolita</i>	81,74	18,26	88,72	11,28
<i>Sarcina citrea</i>	81,79	18,21	89,50	10,50

Von den flüssigen Nährböden gewannen wir die Kulturen durch Zentrifugieren und haben die Zellen sodann dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und verfahren dann wie üblich. Die so erhaltenen Werte zeigt die Tab. 1.

Den nach der Verbrennung zurückgebliebenen anorganischen Rückstand analysierten wir spektrographisch qualitative und so weit es möglich war, zogen wir auch quantitative Schlüsse. Die folgenden Elemente konnten wir nachweisen: Ag, Al, B¹, Ca, Cu, Fe, K¹, Mg, Mn, Na, Ni, Si, Sn, V.

Die fettgedruckten Elemente bedeuten jene, welche nicht Bestandteile unseres Nährbodens waren. Sie sind wahrscheinlich durch die Ver-

¹ Da unsere C Elektroden B enthielten, mußten wir zum B-Nachweis Cu-Elektroden verwenden. Diese waren plangeschliffene Stifte von 6 mm Durchmesser. Natürlich mischten wir in diesem Falle die Proben nicht mit Kohlenstaub.

unreinigungen der angewandten Reagentien in den Nährboden gekommen und von dort in die Bakterien. Unsere Vermutungen scheint der Garantieschein des verwendeten Kalium chloratum p.a. zu unterstützen. Nach diesem enthält das Reagens 0,001% Pb, 0,0005% Fe, 0,001% Ba, 0,002 Ca, 0,0005% Mg, 0,02% Na. Leider konnten wir uns

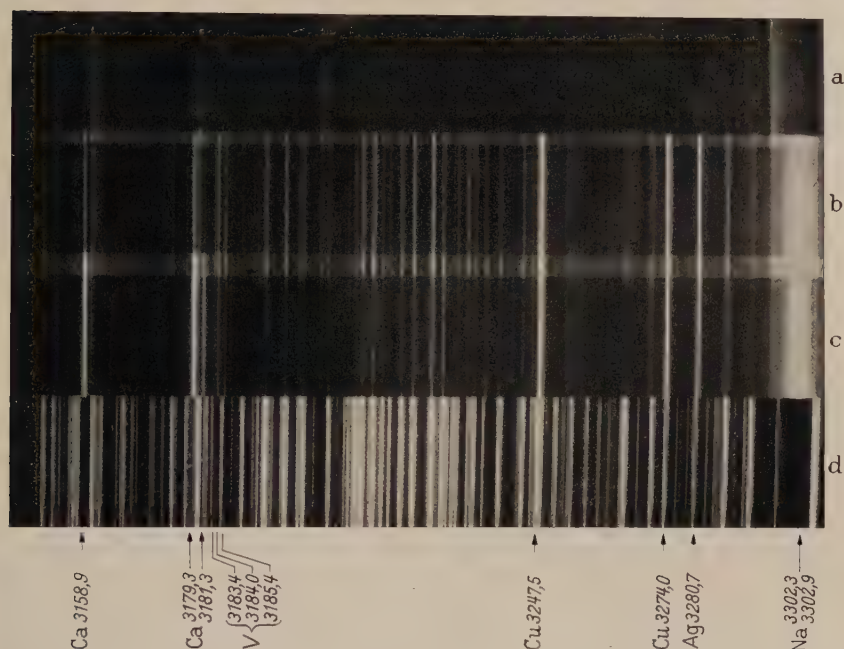


Abb.2

Der Nachweis von Ca, V, Cu, Ag, Na. a C-Elektrode; b *Sarcina citrea*; c *Azotomonas insolita*; d Fe

Tabelle 2. Die Ergebnisse der spektrochemischen Analyse

Bakterien- arten	Elemente														V
	Ag	Al	B ¹	Ca	Cu	Fe	K ¹	Mg	Mn	Na	Ni	Si	Sn		
<i>Azotomonas insolita</i>	3	5	3	5	5	6	3	6	4	6	4	4	2		3
<i>Sarcina citrea</i>	3	5	3	3	5	4	4	6	4	6	4	5	3		3

¹ Cu-Elektrode.

keine spektralreinen Reagentien besorgen. Einige Teile der Spektralaufnahmen zeigt Abb.2, auf welcher wir die zur Analyse benutzten Linien mit Pfeilen kennzeichneten.

Die Ergebnisse der spektrochemischen Analyse sind in der Tab.2 zusammengefaßt. Zum Spurennachweis benutzten wir, soweit es möglich

war, immer die letzten Linien der Elemente bei der Auswertung der Spektren. Bei den Elementen, deren letzte Linien in das Gebiet fielen, welches mit dem ISP-22 Quarzspektrograph nicht mehr gut erfassbar ist, d. h. das Gebiet gegen das rote Ende des Spektrums und das äußere

Tabelle 3
Die Wellenlänge der benutzten Spektrallinien und die Nachweisgrenzen nach Ahrens

Elemente	Die Wellenlänge der benutzten Linien in Å	Die Nachweisgrenze in Prozent mit C-Elektroden
Ag	3280,7	0,00005
Al	3092,7	0,0002
	3082,1	
B	2497,7	0,001 ¹
	2496,8	
Ca	3158,9	0,0002
Cu	3274,0	0,0005
	3247,5	
Fe	3020,6	0,0005
K	4044,0	0,01—0,02 ¹
Mg	2852,1	0,0002
	2795,5	
Mn	2576,1	0,001
	2593,7	
Na	3302,9	0,001
	3302,3	
Ni	3493,0	0,0005
	3414,8	
Si	2881,6	0,002
Sn	2840,0	0,001
V	3185,4	0,0005

¹ Die Nachweisgrenze bezieht sich zwar auf C-Elektrode, doch die Cu-Elektrode zeigt auch keine merkliche Änderung dieser.

Die Intensitätsstärke der beobachteten Linien teilten wir durch Schätzung in folgende Stufen ein (SZÁDECZKY u. FÖLDVÁRINÉ 1955). 0 = keine Spektrallinie zu beobachten; 1 = Spektrallinie unsicher; 2 = schwache Spur; 3 = Spur; 4 = mittelstarke Spektrallinie; 5 = sehr starke Spektrallinie; 6 = außerordentlich starke Spektrallinie.

Diese Intensitätsstufen sind natürlich nur zum Vergleich des Vorkommens von zwei Linien desselben Elementes zu gebrauchen, sind aber ungeeignet, die Konzentrationen der verschiedenen Elemente untereinander zu vergleichen. Es ist selbstverständlich, daß dieselbe Intensitätsstärke eines leicht anregbaren Elementes (z. B. K) einer viel kleineren absoluten Konzentration entspricht, als bei einem schwer anregbaren Element (z. B. Phosphor).

ultraviolette Gebiet, das nur mit extra sensibilisierten Platten erfassbar ist, mußten wir uns mit der Benützung von weniger empfindlichen Linien begnügen. Die bei der Auswertung verwendeten Linien sind aus Tab.3 zu entnehmen. Dort finden wir auch die absoluten Nachweisgrenzen der einzelnen Elemente nach AHRENS (1954), welche der „schwachen Spur“ entsprechen. AHRENS' Angaben beziehen sich zwar auf Gleichstrom-Dauerbogen, doch wir glauben, diese Angaben zur beiläufigen Schätzung ohne weiteres benutzen zu können, da die Brennpause unseres Abreißbogens so kurz war, daß dadurch die Empfindlichkeit nicht wesentlich geändert sein dürfte.

Zusammenfassung

Wir benutzten die Spektrochemie zur Bestimmung der Zusammensetzung von zwei Bakterienarten (*Sarcina citrea* und *Azotomonas insolita*). Zu dieser Bestimmung benötigten wir eine große Menge Bakterien. Diese nahmen wir bei den Vorversuchen von der Oberfläche des festen Nährbodens, später bei den Hauptversuchen durch Zentrifugieren aus dem flüssigen Nährboden, den wir nach DOX u. CZAPEK mit einigen Änderungen herstellten. Wir bestimmten den Wassergehalt, die trockene, die organische, und anorganische Substanz.

Zur spektrographischen Untersuchung diente ein ISP-22 Spektrograph. Die Anregung erfolgte mit 220 V/10 A Gleichstrom-Abreißbogen. Die Spalthöhe hatte 3,2 mm, der Elektrodenabstand betrug 2 mm und die Spaltbreite wählten wir zu 0,005 mm.

Wir konnten in den Bakterienzellen auch solche Elemente nachweisen, welche nicht Bestandteile unseres Nährbodens waren. Sie sind wahrscheinlich durch die Verunreinigungen der angewandten Reagentien in den Nährboden gekommen.

Die spektrochemische Analyse ist einfacher durchzuführen, als die mikrochemischen Verfahren. Die Ergebnisse können auch praktische Anwendung finden, da man bei Kenntnis der elementaren Zusammensetzung der fraglichen Bakterien für sie den optimalen synthetischen Nährboden zusammenstellen kann.

Literatur

- AHRENS, L. H.: Spectrochemical analysis. Addison-Wesley Publish-Company, Cambridge 1954.
- BAUMGÄRTEL, T.: Grundriß der theoretischen Bakteriologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1924.
- BAUTZ, E., u. U. HAGEN: Spektroskopische Untersuchungen der Zytochrome bei Hefekulturen mit verschiedener Anzahl Nadi-positiver Zellen. Naturwissenschaften **41**, 458 (1954).
- BERTRAND, D., et A. DE WOLF: Sur la nécessité du zinc, comme oligoélément pour la synthèse de la tyrosine par l'*Aspergillus niger*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **25**, 2951—2952 (1960).
- BUKATSCH, F., H. SCRICKER, u. H. POSCHENRIDER: Untersuchungen über die Natur der azotobakterfördernden Komponenten in wäßrigen Auszügen von Kaustobiolithen. Zbl. Bakt., II. Abt. **109**, H. 23/25 (1956).
- CRAMER, E.: Arch. Hyg. (Berl.) **23**, 71 (1891); zit. bei BAUMGÄRTEL.
- GORBACH, G., u. O. G. KOCH: Arch. Mikrobiol. **23**, 284 (1955).
- GORBACH, G., T. TERRANOVA u. J. TERRANOVA: Über den Einfluß von Spurenelementen auf Wachstum und Saccharasebildung bei *Aspergillus niger*. I. Der Einfluß von Zink und Eisen allein und in Gegenwart der Spurenelemente Kupfer und Mangan. Arch. Mikrobiol. **26**, 1 (1957a). — II. Der Einfluß von Kupfer und Mangan allein und in Gegenwart der Spurenelemente Zink und Eisen. Arch. Mikrobiol. **26**, 1 (1957b).
- KOCH, O. G., u. G. A. DEDIC: Über den Spurenelementgehalt der Konidien von Schimmelpilzen. Zbl. Bakt., II. Abt. **110**, H. 6/10 (1957a).

- KOCH, O. G., u. G. A. DEDIC: Zur Arbeitstechnik bei biologischen und biochemischen Spurenelementversuchen. Zbl. Bakt., Abt. II **110**, H. 16/20 (1957b).
- MACHER, F.: Hazai gyártmányú szikragerjesztő kibővítése. Mérés és Automatika **3**, 153—155 (1955).
- MACHER, F.: Egyszerű szénelektrodmáró szinképelemzéshez. Magyar Fizikai Folyóirat, IV. köt. 559—562 (1956).
- MACHER, F.: Elektroda-beállító segédberendezés I SZP-22 kvarcspektrográfhhoz. Magyar Fizikai Folyóirat, VI. köt. 247—250 (1958).
- NICOLLE, M., et E. ALLAIRE: Ann. Inst. Pasteur 7 (1909); zit. bei BAUMGÄRTEL.
- REISENAUER, H. M.: Cobalt in nitrogen fixation by a legume. Nature (Lond.) **186**, 375—376 (1960).
- SZÁDECZKY, E., u. M. FÖLDVÁRINÉ VOGL: Geokémiai vizsgálatok magyarországi kőszenek hamuin. Föld. Közl. **LXXXV**, 7—43 (1955).
- TÖRÖK, T., u. O. SZAKÁCS: Réznyomok meghatározása penicillintáptalajokban oldatos szinképelemzéssel. Magyar Kémiai Folyóirat **59**, 7 (1953).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen

Von

H. G. SCHLEGEL, H. KALTWASSER und G. GOTTSCHALK

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. August 1960)

Der Mangel an Untersuchungen über die Wachstumsphysiologie der aeroben wasserstoffoxydierenden Bakterien (Knallgasbakterien) ist in erster Linie auf das Fehlen eines einfachen zuverlässigen Verfahrens zur Kultur unter optimalen Bedingungen zurückzuführen. Die Entwicklung eines Verfahrens zur Submerskultur von Knallgasbakterien unter autotrophen Bedingungen wird erschwert durch den Umstand, daß den Organismen drei notwendige Komponenten des Nährsubstrats (molekularer Wasserstoff, Kohlendioxyd und Sauerstoff) im gasförmigen Zustand zugeführt werden müssen und daß dieses Gasgemisch explosibel ist.

Für die meisten Untersuchungen wurden Knallgasbakterien bisher entweder auf Agar (KLUYVER u. MANTEN 1942; SCHATZ u. BOVELL 1952; ATKINSON u. McFADDEN 1954; ATKINSON 1955, 1956; PACKER u. VISHNIAC 1955; MARINO u. CLIFTON 1955) oder als Kahlhaut auf flüssigen Nährböden (KASERER 1906; NIKLEWSKY 1908; LEBEDEFF 1909; RUHLAND 1922, 1924; SCHLEGEL 1953, 1954) herangezogen. Bei der Kultivierung auf der Oberfläche von Agar oder stagnierenden Nährlösungen bilden sich relativ dicke Schichten und Kahlhäute aus; die Zellen sind verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, und das geerntete Material enthält ein Gemisch von Bakterien verschiedenen physiologischen Alters. Einheitliches Material, das sich einer bestimmten Wachstumsphase zuordnen läßt, ist nach diesen Verfahren nicht zu gewinnen. Die Oberflächentechnik ist außerdem mit einem großen Arbeitsaufwand verknüpft und erfordert unphysiologisch lange Bebrütungszeiten; nach 4—5 Tage langer Inkubation von 150 beimpften Agarplatten wurden 2,5 g Zellen (Tr. Gew.) geerntet (PACKER u. VISHNIAC 1955).

Knallgasbakterien in Flüssigkeitskultur durch Schütteln unter einer Knallgasatmosphäre zum Wachstum zu bringen (BERGMANN, TOWNE u. BURRIS 1958; LINDAY u. SYRETT 1958), stellt eine wesentliche Verbesserung dar; die Anwendung dieses Submersverfahrens ist jedoch auf kleine Mengen beschränkt.

Bei der Durchströmung der beimpften Minerallösung mit dem CO_2 -Knallgasgemisch in einem geschlossenen System (WILSON, STOUT, POWELSON u. KOFFLER 1953; COHEN u. BURRIS 1955; BERGMANN, TOWNE u. BURRIS 1958) sind die Wachstumsbedingungen für Knallgasbakterien offensichtlich optimal, und das Verfahren empfiehlt sich zur Anzucht von Massenkulturen. Das Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die bei der forcierten Begasung auftretende Schaumbildung durch den Zusatz eines Anti-Schaum-Mittels unterbunden werden muß. Einen gangbaren

technisch jedoch schwierigeren Weg stellt das Umpumpen der beimpften Nährlösung durch eine mit Glaskugeln gefüllte und mit dem Gasgemisch durchströmte Säule dar (McFADDEN 1959).

Die wichtigste Voraussetzung für das optimale Wachstum von Knallgasbakterien in homogener Suspension ist die Sättigung der Flüssigkeitsphase mit den Gaskomponenten. In unserem Laboratorium hat sich ein Submersverfahren zur autotrophen Kultur von Knallgasbakterien ausgezeichnet bewährt, bei dem die Verteilung des Gasgemisches in der Minerallösung durch kräftige Magnetührung bewirkt wird. Der technische Aufwand ist gering. Bei intensiver Rührung schreitet das Zellwachstum bis zu 1 g Trockengewicht/l Nährlösung logarithmisch fort.

Methoden

Die Trübungsmessung wurde als Absorptionsmessung in 1 cm-Cuvetten bei 436 m μ im Eppendorf-Photometer vorgenommen; es wurde nur innerhalb des Extinktionsbereiches zwischen 0,1 und 0,3 gemessen. Der Proteingehalt der Suspension wurde nach der durch LA RIVIÈRE (1958) für Bakterien modifizierten Biuretmethode nach WEICHSELBAUM (1946) bestimmt.

Die Zellzahl wurde durch Auszählen in der Thomaschen Zählkammer (nach Neubauer) ermittelt. Die Bestimmung des Gesamt-N erfolgte nach KJELDAHL. Das Trockengewicht wurde nach zweimaligem Waschen der Zellen in dest. Wasser und Trocknung bei 85°C bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Der pH-Wert der Nährlösungen und Puffer wurde unter Kontrolle mit der Glaselektrode und dem pH-Meßgerät der Fa. Methrom AG eingestellt. Die Gaswechselmessungen erfolgten in den üblichen zweiarmigen Gefäßen von ca. 15 ml Rauminhalt in der Rundwarburgapparatur (Modell V der Fa. Braun/Melsungen); 116 Hin- und Hergänge/min; 4 cm Schüttelamplitude.

Nährlösung. Das Mineralmedium enthielt auf 1000 ml dest. Wasser: 9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 1,5 g KH₂PO₄; 1,0 g NH₄Cl; 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O; 1,2 mg FeNH₄-Citrat; 20 mg CaCl₂; 2 ml Hoagland-Lösung; 0,5 g NaHCO₃ (getrennt sterilisiert). Der pH-Wert betrug 6,8–7,0. Zur heterotrophen Kultur wurden an Stelle von Bicarbonat 2 g Glutamat zugefügt.

Organismus. Der untersuchte Organismus (*Hydrogenomonas* Stamm 20) ist ein gramnegatives, nicht-sporenbildendes, bewegliches Kurzstäbchen. Die Zellen sind 1,5–1,7 μ lang und 0,8–1,0 μ breit. In flüssigen Nährböden lösen sich die Zellen leicht voneinander, bilden homogene Suspensionen, ohne zu verklumpen; Hautbildung erfolgt selbst in stagnierender Lösung nicht.

Auf Mineralagarplatten wächst der Organismus in Form runder, schwach gewölbter, glänzender, gelber Kolonien mit glattem Rand. Bei heterotropher Kultur (Glutamat) unterscheiden sich die Kolonien davon lediglich durch ihre weiße Farbe. Das Wachstum auf Glucose ist schwach.

Der Organismus ist durch weitere biochemische Eigenschaften gekennzeichnet: er wächst auf Bouillon ohne Hautbildung, auf Kartoffelscheiben in Form gelbbrauner Kolonien, bewirkt auf Blutagar keine Hämolyse, verwertet Citrat und eine Reihe organischer Säuren, reduziert Nitrat zu Nitrit, bildet kein Indol, keinen Schwefelwasserstoff, kein Methyläthylcarbinol, verflüssigt Gelatine nicht, alkalisiert und koaguliert Milch nicht.

Kulturgefäße und Rührapparatur. Als Kulturgefäße (Abb. 1 und 2) wurden 6 l-Zweihalskolben aus Solidexglas verwendet. Sie werden gewöhnlich mit 3–4 l Mineralmedium beschickt. Ein mit zwei Wattefiltern versehener Waschflaschen-

aufsatz, der mit einem NS 29 in den zentralen Hals des Kolbens eingesetzt wird, dient der Zu- und Ableitung des Gases. Durch den zweiten Kolbenhals (NS 29) ragt ein dickes Glasrohr, das oben mit einem Schliffstopfen zu verschließen ist, bis in die Nährlösung; durch dieses Glasrohr lassen sich mit sterilen Pipetten Proben entnehmen, ohne daß Gas entweichen kann. In der Nährlösung befindet sich



Abb. 1. Apparatur zur Submerskultur von Knallgasbakterien unter autotrophen Bedingungen

ein Magnetstab aus Oerstit 400-Fe von 15 mm Durchmesser und 60 mm Länge, der in starkwandigem PVC-Schlauch wasserdicht verschweißt ist. Kolben und Nährlösung werden im Autoklaven sterilisiert; der Magnetstab wird in 80%igem Äthanol aufbewahrt und durch Abspülen mit sterilem Wasser keimfrei gemacht.

Das Gasmisch (75% H_2 , 15% O_2 , 10% CO_2) wird in einem Gasometer hergestellt, das mit einem Ausgleichsgefäß verbunden ist; mit H_2SO_4 angesäuertes Leitungswasser dient als Sperrflüssigkeit. Eine Waschflasche zwischen Gasometer und Kulturgefäß verhindert den etwaigen Übertritt von Sperrflüssigkeit in den Kulturkolben.

Das Gerät (Abb. 1) ist mit sechs Rührstellen ausgestattet. Die in Aussparungen der Tischplatte rotierenden Antriebsmagnete (Oerstit-Beinchenmagnete, Breite 5 cm) werden über eine Transmission von einem 0,5 PS Drehstrommotor mit

stufenlos regelbarem Ganzstahlgetriebe (der Fa. Heynau, München) betrieben. Das Gerät wurde uns von den ortsansässigen Firmen E. Schütt jr. und H. Clodius gebaut.

Nach Beimpfung der Nährlösung wird der Gasraum des Kulturgefäßes mit 10 l Gasmisch durchströmt; sodann bleibt der Gasraum durch einen Schlauch mit



Abb. 2. Einfluß der Rotationsgeschwindigkeit des Magnetrührers auf die Gasverteilung in der Nährlösung. U/min: a = 0, b = 375, c = 650, d = 800

dem Gasometer in Verbindung; die Gasableitung am Kulturkanne wird geschlossen. Abb. 2a—d veranschaulicht die durch die Rührung bewirkte Verteilung des Gases in der Minerallösung bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten. Wir ziehen Knallgasbakterien routinemäßig bei 650 U/min heran.

Ergebnisse

1. Wachstumskurve

Zur Ermittlung der Wachstumskurve wurde ein 61-Kolben (31 Minerallösung) mit Zellen beimpft, die von einer 4 Tage lang autotroph bebrüteten Mineralagarplatte stammten; alle 2 Std wurde mit 4 l einer

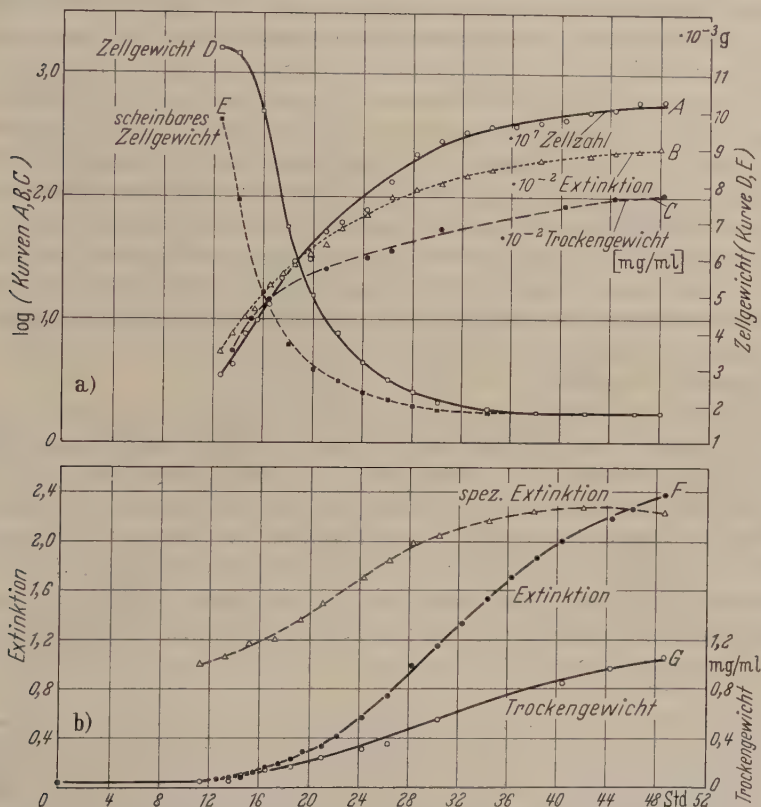


Abb. 3a u. b. a Veränderung der Zellzahl (A), der Extinktion (B), des Trockengewichts (C), des Zellgewichts (D) und des scheinbaren Zellgewichts (E) während des autotrophen Wachstums (A—C halblogarithmisch); b Zunahme des Trockengewichts, der Extinktion und der spezifischen Extinktion (Extinktion je Milligramm Trockengewicht). 61-Zweihalskolben mit 31 Minerallösung pH 7,0; Impfung mit 4 Tage alten auf Agarplatten gezogenen Zellen; 28° C; 650 U/min; Gasmischung 85% H_2 , 10% O_2 , 5% CO_2

Abb. 3a rechts oben statt 10^{-3} g lies: 10^{-13} g .

Gasmischung von 85% H_2 , 10% O_2 und 5% CO_2 durchströmt. Diese in kurzen Intervallen wiederholte Durchströmung erwies sich als notwendig, da H_2 und O_2 von den Bakterien annähernd im Verhältnis 3:1 umgesetzt werden und die Atmosphäre somit im Laufe des Wachstums an O_2 verarmt. Trübung und Gesamtzellzahl wurden von Anfang an bestimmt, Trockengewicht, Biuret- und Kjeldahl-Stickstoff erst in der

logarithmischen Wachstumsphase. Abb. 3a gibt (in halblogarithmischer Darstellung) die Zunahme der Gesamtzellzahl (Kurve A), der Trübung (Kurve B) und des Trockengewichtes (Kurve C) während eines 50stündigen Wachstumsversuches wieder. Unter den gegebenen Bedingungen — mit nur 10% O₂ in der Gasatmosphäre — ist die Phase der exponentiellen Teilungsrate verhältnismäßig kurz; schon von der 20. Std an setzt eine Abnahme der Teilungsrate ein, die offenbar auf die Begrenzung der Sauerstoffdiffusion zurückzuführen ist. Der Anstieg der Kurven für das Trockengewicht und die Trübung ist geringer. In Kurve D ist der Quotient Trockengewicht/Gesamtzellzahl = Zellgewicht aufgetragen. Die Zellen erreichen zu Anfang der logarithmischen Teilungsphase ihren höchsten Trockensubstanzgehalt. Im Laufe der log-Phase nimmt das Zellgewicht zunächst rasch, dann langsamer ab. Es ist deutlich, daß sich die Zelldimensionen auch während der log-Phase ständig verändern, die Zellen also keine „Standardzellen“ darstellen (HENRICI 1923; MARTIN 1932; HERSHEY 1939). Dies ist ein bei physiologischen Untersuchungen an Zellen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt geerntet werden, zu beachtender Umstand.

In Kurve E ist der Quotient „scheinbares Trockengewicht“¹/Zellzahl = „scheinbares Zellgewicht“ (HERSHEY 1939) aufgetragen. Das „scheinbare Zellgewicht“ weicht von dem wahren erheblich ab. Die Abweichung beruht auf der Abhängigkeit der Lichtstreuung von der Größe der streuenden Teilchen. Ein Vergleich der Kurve G (Trockengewichte) in Abb. 3b mit Kurve F (Extinktionswerte) zeigt, daß das Verhältnis Extinktion/Trockengewicht = „spezifische Extinktion“ vom Beginn der log-Phase an zunimmt; mit Abnahme des Zellgewichtes, d. h. der Teilchengröße, nimmt die spezifische Extinktion zu.

2. Ermittlung von Wachstumskonstanten durch Gaswechselmessungen

Die optimalen Wachstumsbedingungen (pH, Temperatur, pCO₂, pO₂, pH₂) wurden durch Messung der Gasaufnahme einer sehr dünnen Suspension (0,005—0,015 mg Zelltrockengewicht) über einen Zeitraum von 8 Std ermittelt. Aus der logarithmischen Phase der Submerskultur abpipettierte Zellen vermehren sich in den Warburg-Gefäßen ohne lag-Phase. Da die Gasaufnahme von log-Phasen-Zellen der Zunahme der Zellmasse proportional gesetzt werden kann, läßt sich das Wachstum am Anstieg der Gasaufnahme verfolgen. Den Optimumskurven (Abb. 4—6) liegt die relative Zunahme (r.Z.) der Gasaufnahme zwischen der 3. und 6. Versuchsstunde zugrunde (siehe Legende Abb. 4).

¹ Das „scheinbare Trockengewicht“ ist der Extinktion streng proportional und errechnet sich aus den Extinktionswerten und einem einmalig bestimmten Faktor (Extinktion/Trockengewicht am Versuchsende).

Stamm 20 wächst in einem verhältnismäßig breiten p_H -Bereich (Abb. 4). Das Wachstumsoptimum liegt zwischen p_H 6,5 und 7,0. Abweichungen des p_H nach der sauren Seite vom Neutralpunkt beeinträchtigen das Wachstum weniger als Abweichungen nach der alkalischen Seite.

In Abb. 5 kommt die hohe Empfindlichkeit des untersuchten Stammes gegenüber höheren Sauerstoffpartialdrücken zum Ausdruck. Bei einem

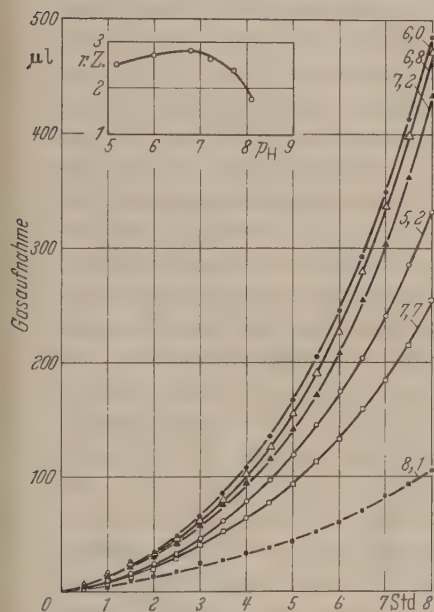


Abb. 4

Abb. 4. Gasaufnahme unter Wachstumsbedingungen bei variiertem p_H . 3 ml Mineralmedium je Warburg-Gefäß geimpft mit 0,005 mg Zellen (Trockengewicht); 30° C; Gasatmosphäre 30% Luft, 65% H_2 , 5% CO_2 ; die genauen p_H -Werte der mit Phosphat gepufferten Mineralösungen wurden mit der Glaselektrode nach Sättigung mit dem Gasgemisch bestimmt. Zur Darstellung der p_H -Optimumskurve wurde die relative Zunahme der Gasaufnahme zwischen der dritten und sechsten Versuchsstunde aufgetragen

$$r. Z. = \frac{\mu l \text{ Gasaufnahme nach 6 Std} - \mu l \text{ Gasaufnahme nach 3 Std}}{\mu l \text{ Gasaufnahme nach 3 Std}}$$

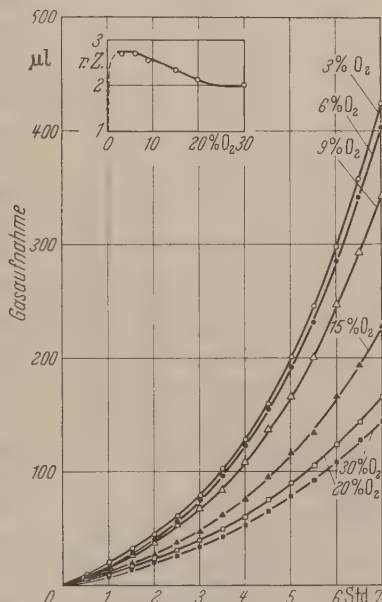


Abb. 5

Abb. 5. Gasaufnahme unter Wachstumsbedingungen bei variiertem p_{O_2} . 3 ml Mineralmedium je Warburg-Gefäß geimpft mit 0,008 mg Zellen (Trockengewicht); 30° C; p_H 6,5; Gasatmosphäre 30% H_2 , 5% CO_2 , 3—30% O_2 mit N_2 auf 100% aufgefüllt. Optimumskurve wie Abb. 4

Sauerstoffgehalt der Atmosphäre von 30% kommt es gerade noch zum Wachstum; oberhalb 40% wird das Wachstum unterdrückt, wie bereits mehrfach beobachtet wurde (SCHATZ u. BOVELL 1952; SCHLEGEL 1953). Bei dem geringsten geprüften O_2 -Partialdruck (3% O_2) ist die Wachstumsgeschwindigkeit am größten. Es ist zu bemerken, daß die vorliegende Messung an sehr dünnen Suspensionen vorgenommen wurde, die eine

eben noch sichtbare Trübung verursachten. Unter diesen Bedingungen stehen die gelösten Gase im Gleichgewicht mit der Gasatmosphäre, und der pO_2 in der Lösung entspricht dem im Gasraum. Die Optimumskurve gibt demzufolge die „wahre“ Abhängigkeit des Zellwachstums vom Sauerstoffpartialdruck wieder. Wird das Wachstum bei höheren Zellkonzentrationen jedoch durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs begrenzt, so wirken höhere O_2 -Partialdrücke fördernd.

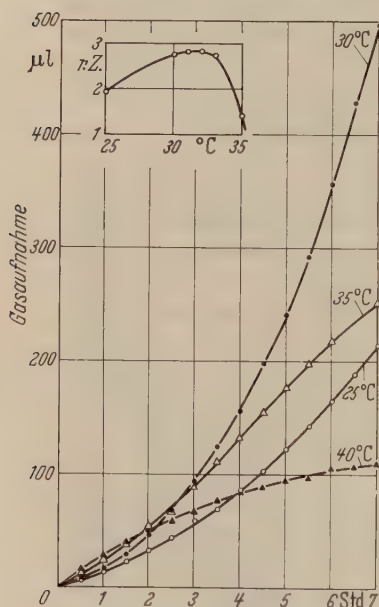


Abb. 6. Gasaufnahme unter Wachstumsbedingungen bei variiertem Temperatur. 3 ml Mineralmedium je Warburg-Gefäß geimpft mit 0,015 mg Zellen (Trockengewicht); pH 6,5; Gasatmosphäre 65% H_2 , 30% Luft, 5% O_2 ; Optimumskurve wie Abb. 4

unabhängig. Bei noch geringeren H_2 -Konzentrationen verfolgten wir nicht das Wachstum, sondern bestimmten die Hydrogenaseaktivität. Die halbe maximale Geschwindigkeit der H_2 -Oxydation wird bei 0,007 at erreicht.

3. Abhängigkeit des Wachstums vom Sauerstoffpartialdruck bei verschiedenen Zelldichten

Bei der Ermittlung der „wahren“ Abhängigkeit des Wachstums von Knallgasbakterien (Stamm 20) wurde mit kleinen Sauerstoffkonzentrationen (3% O_2) die größte Wachstumsrate erzielt. Unter den angewendeten Bedingungen bei äußerst geringer Bakterienkonzentration bestand zwischen dem pO_2 in der Gasatmosphäre und in der Suspensionsflüssigkeit ein völliges Gleichgewicht im Sinne des Henry-Daltonschen Gesetzes.

Das Temperaturoptimum des Wachstums beträgt 32°C (Abb. 6). Bei höheren Temperaturen (35 und 40°C) ist die Gasaufnahme zwar zunächst infolge der höheren Reaktionsgeschwindigkeit der vorhandenen Enzyme größer; aus der abfallenden Tendenz der Gasaufnahme ist jedoch zu schließen, daß keine Zellvermehrung eintritt und das Enzymsystem sogar geschädigt wird.

Vom CO_2 -Partialdruck ist das Wachstum im Bereich von 1–10% nahezu unabhängig; bei höheren CO_2 -Gehalten kommt es zu einer Beeinträchtigung der Gasaufnahme. Inwieweit das Wachstum bei verschiedenen H^+ -Ionenkonzentrationen durch verschiedene CO_2 -Partialdrücke beeinflusst wird, wurde nicht untersucht.

Im Bereich von 3–80% H_2 ist das Wachstum vom H_2 -Partialdruck nahezu

Bei höheren Bakteriendichten, wie sie im Laufe des Wachstums einer Kultur gewöhnlich auftreten, herrschen andere Verhältnisse: Die Aufnahme des gelösten Sauerstoffs durch die Organismen erfolgt rascher als durch O_2 -Diffusion aus der Gasphase in Lösung gebracht werden kann. Selbst bei Vergrößerung der Phasengrenzflächen durch feine Verteilung des Gases in der Flüssigkeit (durch Rühren, Schütteln oder Durchperlen) bleibt eine Sauerstoffsättigung der Lösung aus. In einer durch aktiv sauerstoffzehrende Mikroorganismen sichtbar getrübten Nährlösung wird der O_2 -Partialdruck stets geringer sein als in der angrenzenden Gasatmosphäre.

Die wachstumsbeschleunigende Wirkung höherer O_2 -Partialdrücke auf die Zellen in einem fortgeschrittenen Stadium der Kultur war bereits bei Untersuchungen an Stamm 16 beobachtet worden (WILDE, unveröffentlicht). In Abb. 7 ist das Ergebnis eines Versuches dargestellt, bei dem verschieden stark beimpfte Nährlösungen unter Gasmischungen verschiedenen O_2 -Gehalts bebrütet wurden. Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung verfolgt. Bei einer geringen Ausgangszellkonzentration hemmt ein hoher O_2 -Partialdruck

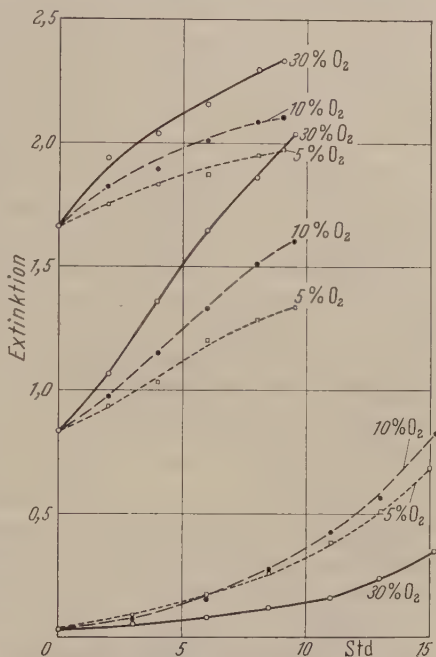


Abb. 7. Abhängigkeit des Wachstums vom pO_2 bei verschiedenen Zellkonzentrationen. 31 Mineralmedium pH 6,8, in 6 l-Zweihalskolben bei $28^\circ C$, Rotationsgeschwindigkeit 650 U/min; beimpft von Flüssigkeits-Vorkultur; Gasatmosphäre 5, 10 und 30% O_2 + 10% CO_2 + H_2 ad 100%; Trübungsmessung

(0,3 at) das Wachstum; der rascheste Anstieg der Trübung erfolgt zunächst mit 5%, später mit 10% O_2 in der Gasmischung. Die Aufkrümmung der Kurven deutet auf exponentielles Wachstum in diesem Bereich. Bei einer höheren Ausgangszellkonzentration ($E = 0,83$) kommt in der Geradlinigkeit des Anstiegs der Trübung zum Ausdruck, daß die Zellen arithmetisch wachsen, die Wachstumsrate also durch einen konstant wirkenden Faktor begrenzt wird; die mit zunehmendem Sauerstoffgehalt des Gasmisches (5, 10, 30% O_2) wachsenden Anstiegswinkel deuten darauf hin, daß es sich bei dem begrenzenden Faktor um die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs handelt. Von noch höheren Zelldichten ($E = 1,66$) ausgehend zeigen

die Wachstumskurven sogar fallende Tendenz: Der Zuwachs ist in diesem Bereich der Gasaufnahme nicht mehr proportional.

Für die Massenkultur von Knallgasbakterien ist ihre „wahre“ Sauerstoffempfindlichkeit ohne Bedeutung, sobald ihr Sauerstoffkonsum bei fortgeschrittenem Wachstum zu einem Ungleichgewicht der O_2 -Partialdrücke von Gas- und Flüssigkeitsphase führt. Unter den gewählten Wachstumsbedingungen (650 U/min; $28^\circ C$; 3–4 l Minerallösung in 6 l-Kolben) entwickelt sich die Kultur am schnellsten, wenn ein Gasgemisch mit zunächst 10% O_2 und nach Erreichen einer Bakterienkonzentration von $E = 0,5$ – $0,8$ mit 30% O_2 verabfolgt wird.

Die Verwendung eines 30% O_2 enthaltenden Gasgemisches bringt auch eine Erleichterung in der Betreuung der Kultur mit sich, da es die Komponenten annähernd in dem Volumenverhältnis enthält, in dem die Gase während des Wachstums aufgenommen werden ($H_2:O_2:CO_2 = 5,8:1,8:1$ nach MARINO u. CLIFTON 1955). Damit erübrigt sich ein in kleinen Zeitabständen wiederholtes Durchströmen. Bei einer geeigneten Anordnung von hintereinandergeschalteten Gasreservoirs, die mit verschiedenen Gasgemischen gefüllt sind — durch „Gradientenbegasung“ — kann die Kultur bis zum Erreichen der stationären Phase sogar sich selbst überlassen bleiben.

Diskussion

Knallgasbakterien wachsen in einem einfachen Mineralmedium, das NH_4Cl als N-Quelle und Spurenelemente sowie Eisen enthält. Obwohl eingehende Untersuchungen über die Abhängigkeit des Wachstums von der Zusammensetzung der Minerallösung noch nicht vorliegen, deuten Beobachtungen darauf hin, daß Knallgasbakterien Konzentrationsänderungen der Einzelkomponenten in einem weiten Bereich tolerieren. Demgegenüber sind die Zusammensetzung der Gasatmosphäre und alle Faktoren, die den Transport der Gaskomponenten zu den Zellen kontrollieren, von entscheidendem Einfluß auf die Wachstumsrate. Da Kohlendioxyd von wäßrigen Lösungen schnell absorbiert wird, steht es den Zellen stets in ausreichender Menge zur Verfügung. Auch der molekulare Wasserstoff gelangt infolge seines kleinen Molekülvolumens und seiner hohen Diffusionsgeschwindigkeit genügend schnell zu den Orten des Verbrauchs; bei unseren Versuchen ($p_{H_2} > 0,1$ at) stellte die H_2 -Diffusion nie den begrenzenden Faktor dar. Von allen Faktoren, die das Wachstum in Submerskultur beeinflussen, kommt dem Sauerstoff die größte Bedeutung zu. Damit reduziert sich die Frage der Gasversorgung bei den Knallgasbakterien auf das Problem der Sauerstoffzuführung, das bei der Submerskultur aller intensiv sauerstoffzehrenden, streng aerophilen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle spielt (RAHN u. RICHARDSON 1941, 1942; VAN NIEL 1949).

Nur bei ganz geringen Zelldichten, solange eine Trübung visuell kaum wahrzunehmen ist, wird der im Medium gelöst befindliche Sauerstoff dem O_2 -Partialdruck in der Gasphase im Sinne des Henry-Daltonschen-Gesetzes entsprechen. Mit zunehmendem O_2 -Konsum der Organismen tritt ein wachsendes O_2 -Defizit in der Lösung auf, bis das Wachstum schließlich durch O_2 -Mangel beeinträchtigt wird. Bei höheren Zelldichten mißt man nicht die Wachstumsrate, sondern die Geschwindigkeit der O_2 -Zuführung. Man kann die Länge der Phase des exponentiellen Wachstums als Maß für die Wirksamkeit der Sauerstoffversorgung ansehen.

Eine möglichst langanhaltende ausreichende Sauerstoffversorgung wird bei unserem Verfahren durch kräftige mechanische Rührung und durch Verwendung eines sauerstoffreichen Gasgemisches erzielt. Dieses bei einer großen Anzahl aerophiler Organismen bedenkenlos anwendbare Verfahren wird bei Knallgasbakterien wegen ihrer O_2 -Empfindlichkeit insofern erschwert, als hohe O_2 -Partialdrücke das Wachstum bei geringen Bakteriendichten hemmen (Abb. 5 u. 7). Daß sich dieser ausgeprägten O_2 -Empfindlichkeit durch eine Art „Gradienten-Begasung“ unter allmählicher Steigerung des O_2 -Gehalts von 5 auf 30% Rechnung tragen läßt, wurde bereits erwähnt.

Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß sich die Trockengewichtszunahme während des Wachstums nicht durch Trübungsmessung verfolgen läßt. Es hat sich eingebürgert, von der Trübung, die als Extinktion oder „optical density“ gemessen wird, auf die Zellmasse zu schließen. Selbst HERSHEY (1939) schließt aus Versuchen an *Escherichia coli* „it can be seen that the ratio of turbidity to nitrogen is constant within the expected error in spite of the threefold difference in average size of cells in the two suspensions. The nephelometric method is, therefore, suitable for the estimation of bacterial mass in cultures of different age...“. Es wird sogar aus Werten, die durch Absorptionsmessung gewonnen sind, die Generationsdauer berechnet (COHEN u. BURRIS 1955). Diese Verfahren sind jedoch nur in ganz grober Annäherung zur Wiedergabe der richtigen Verhältnisse geeignet.

Die Zellen machen während des Wachstums einer stationären Kultur beträchtliche Größenänderungen durch. Mit diesen Größenänderungen geht eine Veränderung der relativen Oberfläche der Zellen und der „spezifischen“ (auf das Trockengewicht oder die Zellmasse bezogenen) Extinktion einher.

Bebrütungs- dauer Std	Trocken- gewicht mg/ml	Extinktion	spez. Extinktion
15	0,1	0,12	1,20
30	0,55	1,12	2,04
45	0,99	2,26	2,28

Einer Zunahme der Zellgröße entspricht eine Abnahme der „spezifischen Extinktion“. Diese aus Abb. 3b ersichtliche mit abnehmender Zellgröße steigende spezifische Extinktion, die sich übrigens auch aus den von HERSHEY (1939) angegebenen Protokollen entnehmen läßt, steht im Einklang mit der MIESCHEN Theorie für die Streuung des Lichtes. Die Streuung ist abhängig von der Teilchengröße und der Anzahl der Teilchen. Aus der Trübungsmessung — gleichgültig, ob sie turbidimetrisch oder nephelometrisch erfolgt — wird sich demnach nicht auf die Zellmasse schließen lassen, sofern nicht nachgewiesen wird, daß die Teilchen in dem betrachteten Bereich in ihrer Größe und anderen die Lichtstreuung bestimmenden Qualitäten konstant bleiben.

Nach unserem Submersverfahren wurde mit Stamm 20 eine relativ hohe Wachstumsrate gemessen. Aus den log-Phasen der Wachstumskurven (Abb. 3) errechnet sich eine Generationszeit von 2 Std 10 min (aus der Zunahme der Zellkonzentration) und eine „scheinbare“ Verdoppelungszeit von 3 Std 12 min (aus der Zunahme der Extinktion) für 28°C. Für *Hydrogenomonas facilis* in Submerskultur wurde eine Verdoppelungszeit (bei 30°C) von 7 $\frac{1}{2}$ Std (COHEN u. BURRIS 1955) und 5 Std (BERGMANN, TOWNE u. BURRIS 1958) angegeben. Die scheinbare Verdoppelungszeit, die von den Autoren Generationszeit genannt wird, wurde aus den Extinktionswerten berechnet. Unsere Messungen machen jedoch deutlich, daß man zwischen „Generationszeit“ und „Verdoppelungszeit“ zu unterscheiden hat. Für die Gasaufnahme ergibt sich eine Verdoppelungszeit von nur 1 $\frac{1}{2}$ —1 $\frac{3}{4}$ Std unter günstigsten Verhältnissen (Abb. 4 und 6).

Für weitere Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien wird das beschriebene Verfahren die Methode der Wahl sein. Es bietet die besten Voraussetzungen für die Entwicklung eines kontinuierlichen Kulturverfahrens. Wegen der technischen Einfachheit und der leichten Kultivierbarkeit der Knallgasbakterien empfiehlt es sich auch zur Biosynthese von ^{14}C -markierten Verbindungen (NEWTON u. WILSON 1954) aus Kohlendioxyd. Das Verfahren ist weniger arbeitsaufwendig als andere für diesen Zweck beschriebene Präparationsmethoden (ERB u. MAURER 1960).

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Submerskultur von Knallgasbakterien beschrieben. Es beruht auf der kräftigen Magnetrührung der Nährlösung unter einem Gemisch von H_2 , O_2 und CO_2 . Der hohen O_2 -Empfindlichkeit der Zellen wird durch „Gradientenbegasung“ Rechnung getragen.

Der fakultativ chemolithotrophe *Hydrogenomonas*-Stamm 20 wurde bakteriologisch charakterisiert und wachstumsphysiologisch untersucht.

Die Generationszeit beträgt während der log-Phase $2\frac{1}{6}$ Std, die scheinbare Verdoppelungszeit $3\frac{1}{5}$ Std (28°C).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung durch Apparate und Personalmittel im Rahmen einer Sachbeihilfe.

Literatur

- ATKINSON, D. E., and B. A. McFADDEN: The biochemistry of *Hydrogenomonas*. I. The Hydrogenase of *Hydrogenomonas facilis* in cell-free preparations. *J. biol. Chem.* **210**, 885—893 (1954).
- ATKINSON, D. E.: The Biochemistry of *Hydrogenomonas*. III. The effect of inorganic nitrogen compounds on hydrogen uptake. *J. Bact.* **70**, 78 (1955).
- ATKINSON, D. E.: The biochemistry of *Hydrogenomonas*. IV. The inhibition of hydrogenase by oxygen. *J. biol. Chem.* **218**, 557—564 (1956).
- BERGMANN, F. H., J. C. TOWNE and R. H. BURRIS: Assimilation of carbon dioxide by hydrogen bacteria. *J. biol. Chem.* **230**, 13—24 (1958).
- COHEN, J. S., and R. H. BURRIS: A method for the culture of hydrogen bacteria. *J. Bact.* **69**, 316 (1955).
- ERB, W., u. W. MAURER: Biosynthese von ^{14}C -markiertem Eiweiß mit *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. Z.* **332**, 388—395 (1960).
- HENRICI, A. T.: Morphologic variation and the rate of growth of bacteria. London: Baillière, Tindall & Cox 1928.
- HERSHEY, A. D.: Factors limiting bacterial growth. IV. The age of the parent culture and the rate of growth of transplants of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **37**, 285—299 (1939).
- KASERER, H.: Die Oxydation des Wasserstoffs durch Mikroorganismen. *Zbl. Bakt., II. Abt.* **16**, 681 (1906).
- KLUYVER, A. J., and A. MANTEN: Some observations on the metabolism of bacteria oxidizing molecular hydrogen. *Antonie v. Leeuwenhoek* **8**, 71—86 (1942).
- LA RIVIÈRE, J. W. M.: On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Dissertation. Delft 1958.
- LEBEDEFF, A. F.: Über die Assimilation des Kohlenstoffs bei wasserstoffoxydierenden Bakterien. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **27**, 598—602 (1909).
- LINDAY, M., and P. J. SYRETT: The induced synthesis of hydrogenase by *Hydrogenomonas facilis*. *J. gen. Microbiol.* **19**, 223—227 (1958).
- McFADDEN, B. A.: Some products of $^{14}\text{CO}_2$ -fixation by *Hydrogenomonas facilis*. *J. Bact.* **77**, 339—343 (1959).
- MARINO, R. J., and C. E. CLIFTON: Oxidative assimilation in suspensions and cultures of *Hydrogenomonas facilis*. *J. Bact.* **69**, 188—192 (1955).
- MARTIN, D. S.: The oxygen consumption of *Escherichia coli* during the lag and logarithmic phases of growth. *J. gen. Physiol.* **15**, 691—708 (1932).
- NEWTON, J. W., and J. B. WILSON: CO_2 requirements and nucleic acid synthesis by *Brucella abortus*. *J. Bact.* **68**, 74—76 (1954).
- NIEL, C. B. VAN: The kinetics of growth of microorganisms. The chemistry and physiology of growth. Princeton Univ. Press 1949.
- NIKLEWSKI, B.: Ein Beitrag zur Kenntnis wasserstoffoxydierender Mikroorganismen. II. *Zbl. Bakt., II. Abt.* **20**, 469—473 (1908).
- PACKER, L., and W. VISHNIAC: Chemosynthetic fixation of carbon dioxide and characteristics of hydrogenase in resting cell suspensions of *Hydrogenomonas Ruhlandii* nov. spec. *J. Bact.* **70**, 216—223 (1955).
- RAHN, O., and G. L. RICHARDSON: Oxygen demand and oxygen supply. *J. Bact.* **41**, 225—249 (1941).

- RAHN, O., and G. L. RICHARDSON: Oxygen demand and oxygen supply. *J. Bact.* **44**, 321—332 (1942).
- RUHLAND, W.: Aktivierung von Wasserstoff und CO₂-Assimilation durch Bakterien. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **40**, 180—184 (1922).
- RUHLAND, W.: Beiträge zur Physiologie der Knallgasbakterien. *Jb. wiss. Bot.* **63**, 321—389 (1924).
- SCHATZ, A., and C. BOVELL: Growth and hydrogenase activity of a new bacterium *Hydrogenomonas facilis*. *J. Bact.* **63**, 87—98 (1952).
- SCHLEGEL, H. G.: Physiologische Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **18**, 362—390 (1953).
- SCHLEGEL, H. G.: Untersuchungen über den Phosphatstoffwechsel der wasserstoffoxydierenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **21**, 127—155 (1954).
- WILSON, E., H. A. STOUT, D. POWELSON and H. KOFFLER: Comparative biochemistry of the hydrogen bacteria. *J. Bact.* **65**, 283—287 (1953).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt/Main

Studien über die Adsorption und Injektion von durch Protamin inaktivierten T5-Phagen

Von

G. SIEFERT-GRETCHMAN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. September 1960)

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß niedermolekulare basische Proteine (Protamine und Histone) die Coliphagen T1 und T5 inaktivieren. Bei der Untersuchung der Kinetik dieser Inaktivierung ergab sich, daß der Anteil aktiver Phagen innerhalb weniger Minuten auf ein nahezu konstantes Sättigungsniveau abfällt, dessen Höhe von der Giftkonzentration bestimmt wird. Diese Sättigung tritt nicht durch Verbrauch des vorhandenen Protamins auf, sondern ist durch resistente Phagen in der Population bedingt. Diese Resistenten sind jedoch keine Mutanten, und durch höhere Protaminkonzentrationen werden auch sie inaktiviert. Eine Erhöhung der Temperatur senkt die Anzahl der Überlebenden, und zwar bei T5 mehr als bei T1. Durch Verwendung von Gummi arabicum konnte die Geschwindigkeit der Inaktivierung verlangsamt und dadurch eine erste, sehr schnelle von einer zweiten, etwas langsameren Reaktion unterschieden werden. Die Schädigung durch Protamin konnte durch einfache physikalische Prozesse nicht rückgängig gemacht werden.

Zweck der vorliegenden Untersuchung war es, diejenige Phase im Vermehrungszyklus von T5 aufzudecken, welche durch Protamin gehemmt wird, um so etwas über die Art der Schädigung von T5 durch Protamin aussagen zu können.

I. Material und Methoden

Phagen: Coliphage T5, in synthetischem Medium („F“, vgl. ADAMS 1950) angereichert und durch Ultrazentrifugation gereinigt. Der Titer der Stammsuspension lag meist zwischen $1 \cdot$ und $5 \cdot 10^{10}$ Phagen/ml.

Bakterien: *Escherichia coli* B; *Escherichia coli* K 12 (λ); *Escherichia coli* K 12 (s).

Protamin: Protaminsulfat „Roche“; 1%ige Lösung; Deutsche Hoffmann-La Roche A.G., Grenzach/Baden.

Inaktivierung von T5 durch Protamin: Die Phagensuspension wurde — nach eventuellem Verdünnen mit Puffer — mit einer 0,01%igen Protaminlösung im Verhältnis 1:1 versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. In den Kontrollen wurden die Phagen mit der entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt.

Weitere Angaben zur Methodik sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt.

II. Ergebnisse

A. Adsorption der inaktivierten T5-Phagen an E. coli B

Im Elektronenmikroskop kann man direkt die Verbindung zwischen inaktivierten Phagen und ihren Wirtsbakterien prüfen. Eine nahezu direkte Messung der Adsorption inaktivierter Phagen an ihre Wirtsbakterien wäre auch mit isoto-pen-markierten Phagen möglich; da jedoch keine entsprechende Ausrüstung verfügbar war, mußten einige indirekte Methoden angewendet werden.

1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen¹

a) Schon die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen eine Adsorption der durch Protamin inaktivierten T5 an *E. coli B* vermuten; denn die Phagen lagen mit den Schwänzen eng an der Bakterienmembran an. Auch fehlten in der Umgebung der Bakterien freiliegende Phagen, die in den Kontrollen mit der adsorptionsresistenten Mutante B/5,1 immer vorhanden waren. Da es jedoch möglich ist, daß die Phagen während der Präparation (Agarfiltrationsmethode nach KELLENBERGER) mechanisch an die Bakterien herangeschwemmt werden, sind diese Aufnahmen allein kein ganz eindeutiger Beweis für die Adsorption der inaktivierten T5 an *E. coli B*.

b) Eine exaktere Adsorptionsbestimmung durch Zusatz von Latex (KELLENBERGER, pers. Mitteilung), bei der nur der Überstand nach der Adsorption präpariert wird und das Verhältnis Phagen:Latex vor und nach der Adsorption verglichen wird, konnte bei den vorliegenden Versuchen nicht angewendet werden. Vermischte man nämlich das Inaktivierungsgemisch mit Latexsuspension, so trat sofort eine makroskopisch sichtbare Agglutination auf, die sich elektronenmikroskopisch als große Zusammenlagerungen von Latexkugeln zeigte. Durch diese Ausfällung wird eine wesentliche Voraussetzung der Methode — die gleichmäßige Verteilung der Latexkugeln in der Versuchssuspension — zerstört.

c) Die Adsorption konnte jedoch elektronenmikroskopisch eindeutig durch Verwendung isolierter Receptorsubstanz für T5² nachgewiesen werden. WEIDEL u. KELLENBERGER (1955) zeigten, daß sich jeweils nur ein Receptorkügelchen an die Schwanzspitze eines T5-Phagen anlagert und ihn dabei inaktiviert, d. h. der Phage kann sich nun nicht mehr an ein Bakterium adsorbieren und sich darin vermehren.

¹ Durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. B. RAJEWSKY konnten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Max Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main, ausgeführt werden. Herrn Dr. W. LIPPERT danke ich für Unterstützung hierbei.

² Herrn Prof. Dr. Dr. W. WEIDEL bin ich für die Überlassung der Receptor-substanz für T5 zu großem Dank verpflichtet.

Bei Verwendung von durch Protamin inaktivierten Phagen müßte sich auch elektronenmikroskopisch feststellen lassen, ob die Schwanz-

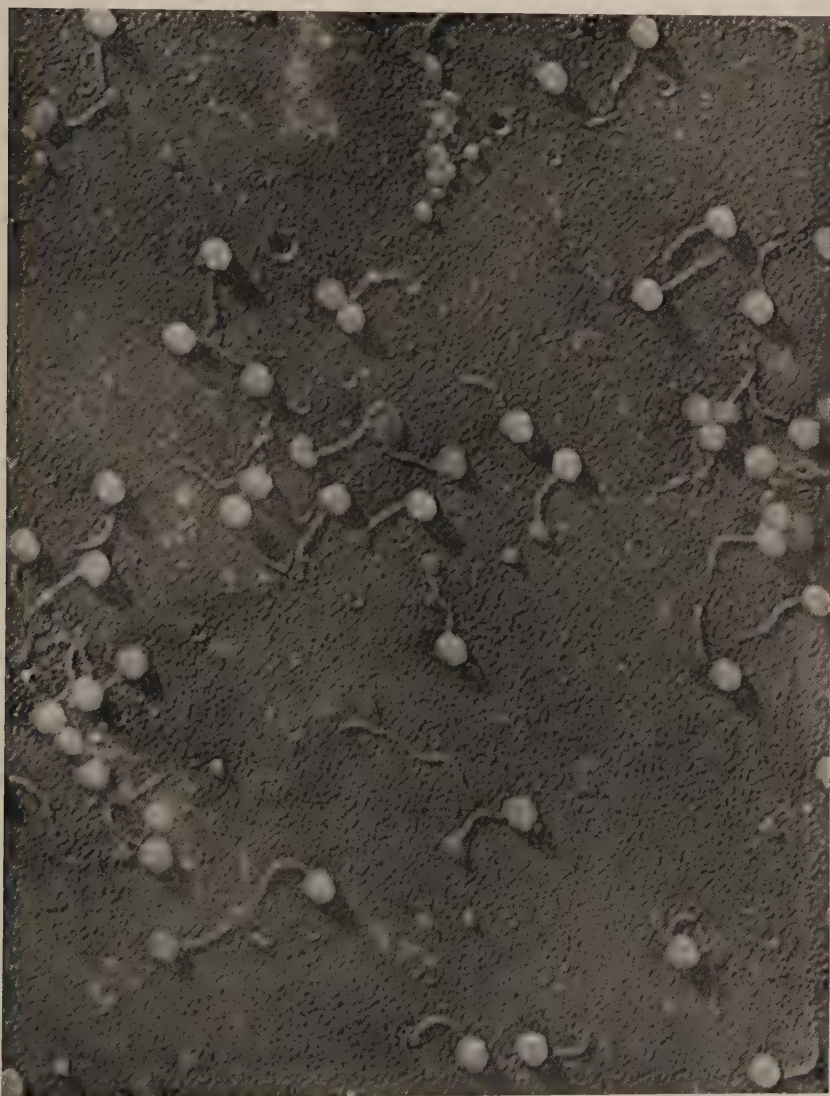


Abb.1. Protamininaktivierte T5-Phagen, denen isolierte Receptorsubstanz (runde Kügelchen) für T5 zugesetzt wurde. Vergr. etwa 54000

spitzen der inaktivierten Phagen noch durch Receptor besetzt werden können oder nicht, ob also der Adsorptionsmechanismus durch Protamin gestört wird.

Die Überlebensrate der Phagen betrug nach Protaminbehandlung 10^{-5} , die Anzahl aktiver Phagen im Versuchsgemisch war also so gering, daß sie für die Beurteilung der Aufnahmen vernachlässigt werden kann. Daß auf Abb. 1 und den entsprechenden Kontrollen nicht alle Phagen mit Receptor besetzt sind, kann auf die Methode zurückgeführt werden: WEIDEL u. KELLENBERGER präparierten in Bouillon, um die besten Ergebnisse zu erhalten. Eine Verwendung von Bouillon bei Protaminversuchen ist jedoch nicht möglich, da hierbei Ausfällungen auftreten. Deshalb mußten die Phagen — wie üblich — in Puffer präpariert werden. Berücksichtigt man jedoch die geringe Anzahl aktiver Phagen im Versuchsgemisch, dann beweisen die Aufnahmen, daß sich protaminaktivierte T5 noch mit Receptorsubstanz verbinden, und damit, daß die Adsorption nicht unterbunden wird.

2. Adsorptionssättigung

Die Adsorptionsfähigkeit der inaktivierten Phagen wurde auch in speziellen Adsorptionsversuchen demonstriert.

Es wurden jeweils drei Parallelansätze gemacht: Röhrchen I enthielt z. B. 10^{10} aktive T5/ml, während in Röhrchen II die gleiche Anzahl Phagen durch Protamin auf 10^7 aktive Überlebende vermindert war. Röhrchen III enthielt nur 10^7 unbehandelte aktive Phagen. Zu den drei Ansätzen wurden je $3,2 \cdot 10^8$ Zellen von *E. coli B* gegeben, nach 20 min bei 37°C durch Zentrifugieren die Komplexe sedimentiert und im Überstand die Anzahl freier Phagen bestimmt.

Werden die inaktivierten T5 noch an *E. coli B* adsorbiert, dann besetzen sie den größten Teil der vorhandenen Receptorstellen für T5 auf den Bakterien, und für die Überlebenden bleiben zur Adsorption wenige Receptorstellen frei. In Röhrchen III befinden sich nur soviel aktive T5, wie den Überlebenden in Röhrchen II entsprechen; diese haben zur Adsorption jedoch die unverminderte Rezeptorenzahl zur Verfügung. Die Phagen in Röhrchen III müßten also stärker adsorbiert werden als die Überlebenden in Röhrchen II.

Die Ergebnisse der Versuche sind aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. Versuch zur Adsorptionssättigung

Röhrchen I T5 unverdünnt + NaCl	Röhrchen II T5 unverdünnt + Protamin	Röhrchen III T5 1:1000 verdünnt + NaCl
+ $3,2 \cdot 10^8$ <i>E. coli B</i>	+ $3,2 \cdot 10^8$ <i>E. coli B</i>	+ $3,2 \cdot 10^8$ <i>E. coli B</i>
Adsorption nach 20 min:		
1. Versuch 84%	54%	85%
2. Versuch 74%	46%	86%

Ein Vergleich der beiden Kontrollröhrchen (I und III) mit dem Versuchsröhrchen (II) zeigt, daß die Adsorption der Überlebenden eines Inaktivierungsgemisches weitaus geringer ist als in den Kontrollen. Das

heißt aber, daß im Versuchsröhrchen schon Receptorstellen durch die inaktivierten Phagen besetzt wurden und damit, daß eine Adsorption der Inaktivierten stattfindet.

B. Tötung des Wirtes

(Untersuchung der Tötungsfähigkeit der inaktivierten Phagen)

Eine Tötung von *E. coli B* durch die adsorbierten inaktivierten T5-Phagen erfolgt nicht. Dies konnte durch Versuche gezeigt werden, bei denen *E. coli B* vergleichsweise mit a) aktiven T5; b) inaktivierten T5; c) der entsprechenden Protaminkonzentration und d) nur mit Puffer versetzt und die Bakterienkonzentration über eine bestimmte Zeit hin geprüft wurde.

Während der Versuchszeit nahm nur in dem Ansatz mit aktiven T5 die Zahl koloniebildender Bakterien erheblich ab — entsprechend der Adsorption der Phagen und Lyse der infizierten Bakterien —, während sie sich bei den inaktivierten Phagen und den Kontrollen mit Protamin und Puffer nur sehr wenig veränderte.

Tabelle 2

Versuch über die Fähigkeit der protamininaktivierten T5-Phagen, Bakterien zu töten ($m = 17,5$)

Titer der aktiven T 5	N/N ₀ nach Protaminbehandlung	Adsorptionszeit	Bakterien + Puffer	Bakterien + inakt. T 5	Bakterien + aktive T 5
$2,8 \cdot 10^9$	$6,32 \cdot 10^{-5}$				
		0 min	$1,6 \cdot 10^8$		
		5 min		$1,05 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^7$
		15 min		$6,3 \cdot 10^7$	$1,19 \cdot 10^7$
		25 min		$4,6 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^6$
		35 min		$3,07 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^6$

Eine Abnahme der Koloniebildung von *E. coli B* zeigte sich nur dann, wenn sich die inaktivierten Phagen in großer Überzahl gegenüber den Bakterien befanden (vgl. Tab. 2: Multiplizität $m = 17,5$). Verwendet man nur geringe Phagenkonzentrationen (bis $m = 5$), dann konnte keine Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit festgestellt werden. Die meisten der inaktivierten Phagen haben demnach mit ihrer Vermehrungsfähigkeit auch die Fähigkeit zur Tötung des Wirtes verloren. Nur ein kleiner Teil dieser Phagen kann *E. coli B* abtöten. Damit ist es klar, daß die starke Verminderung des Phagenlochtiters nicht darauf beruhen kann, daß die durch Protamin veränderten Phagen die von ihnen infizierten Bakterien töten. Vielmehr findet in diesen Komplexen keine Phagenvermehrung statt, und die Zelle überlebt meist die Adsorption.

C. Reaktivierung durch Trypsin

Es wäre möglich, daß das Protamin nur eine für die Aktivität wichtige Stelle abdeckt oder blockiert, ohne daß diese irreversibel zerstört wird. Deshalb wurde untersucht, ob sich die inaktivierten T5 reaktivieren lassen, wenn sie mit einem Enzym behandelt werden, welches Protamin abbaut.

Anstelle einer schwer zu beschaffenden Protaminase wurde Trypsin¹ verwendet. Nach KLECZKOWSKI (1956) baut Trypsin das Protamin Clupein zu kleineren Peptiden ab, die ohne Einfluß auf Bakteriophagen sind.

Zu inaktivierten Phagen wurde Trypsin der Konzentrationen 0,75% und 2,25% zugesetzt und das Gemisch 60 min bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden unbehandelte Kontrollen den gleichen Trypsinkonzentrationen ausgesetzt.

Tabelle 3

Versuch zur Reaktivierung der protamininaktivierten T5 durch 0,75%iges Trypsin

Überlebende T5 nach Protamin- behandlung	Dauer der Protamin- einwirkung	Dauer der Trypsin- einwirkung	Inaktivierte T5 + Trypsin	Unbehandelte T5 + Trypsin
$9,5 \cdot 10^{-5}$	5 min	0 min	$8,9 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^{10}$
		15 min	$1,07 \cdot 10^5$	$8,06 \cdot 10^9$
		30 min	$9,4 \cdot 10^4$	$7,90 \cdot 10^9$
		60 min	$8,0 \cdot 10^4$	$8,30 \cdot 10^9$
$6,95 \cdot 10^{-5}$	15 min	0 min	$5,8 \cdot 10^4$	$1,17 \cdot 10^{10}$
		30 min	$5,21 \cdot 10^5$	$9,91 \cdot 10^9$
		60 min	$2,19 \cdot 10^5$	$8,97 \cdot 10^9$
		150 min	$2,14 \cdot 10^5$	$8,98 \cdot 10^9$
$7,74 \cdot 10^{-5}$	30 min	0 min	$8,90 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^{10}$
		15 min	$3,20 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{10}$
		30 min	$4,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{10}$
		60 min	$5,97 \cdot 10^5$	$1,61 \cdot 10^{10}$

Aus Tab. 3 ergibt sich, daß der Titer der unbehandelten Phagen durch 0,75%iges Trypsin nicht beeinflusst wird, während bei den inaktivierten Phagen ein kleiner Titeranstieg zu verzeichnen ist. Der Anstieg kann durch 2,25%iges Trypsin nicht gesteigert werden. Die Tab. 3 zeigt ferner: je länger Protamin auf die Phagen einwirken konnte, bevor Trypsin zugegeben wurde, desto mehr Phagen konnten reaktiviert werden, obwohl die Rate überlebender Phagen sich dadurch nicht änderte, also der früher gefundenen Sättigung der Inaktivierung unterliegt (SIEFERT-GRETCHMAN u. KAPLAN 1958). Während bei nur 5 min Protamineinwirkung der Überlebens-titer durch Trypsinnachbehandlung überhaupt nicht anstieg, wurde er bei 15 min Protamineinwirkung von $6 \cdot 10^4$ auf $2 \cdot 10^5$ (3,3fach), bei 30 min von $9 \cdot 10^4$ auf $6 \cdot 10^5$ (6,4fach) erhöht.

¹ Trypsin, Fa. E. Merck, Darmstadt.

Es wird also nur ein sehr geringer Bruchteil der inaktivierten Phagen durch Trypsin wieder reaktiviert, während die Hauptmenge unbeeinflusst bleibt.

In einer früheren Arbeit (SIEFERT-GRETCHMAN u. KAPLAN 1958) konnte gezeigt werden, daß durch die gleiche Protaminmenge mehrere Phagenzugaben nacheinander inaktiviert werden können, d. h. daß das Protamin nicht verbraucht wird. Um in den vorliegenden Versuchen festzustellen, daß die verwendete Trypsinkonzentration und die Einwirkungszeiten auch wirklich ausreichten, alles in Lösung vorhandene Protamin zu spalten, wurden den Ansätzen anschließend nochmals aktive T5 zugesetzt. Der Titer dieser zweiten Phagenmenge blieb stets erhalten. Daraus ergibt sich, daß alles frei vorhandene Protamin enzymatisch gespalten worden war und daß etwa reaktivierte Phagen nicht durch unzersetztes Protamin neu inaktiviert worden sind. Der weitaus größte Teil der protamininaktivierten Phagen ist also nicht durch Trypsin reaktivierbar.

D. Prüfung auf wirksame Injektion

Da die Versuche gezeigt haben, daß durch Protamin die Adsorption nicht verhindert wird und daß die Wirtsbakterien nur sehr schwach von den inaktivierten T5 getötet werden, mußte weiterhin untersucht werden, ob die inaktivierten Phagen noch weitere Schritte der Phagenentwicklung vornehmen können, insbesondere, ob sie noch ihre DNS injizieren oder nicht.

1. Multiplizitätsreaktivierung

Multiplizitätsreaktivierung setzt eine Injektion der Phagen-DNS voraus; denn sie besteht ja im Freiwerden von vermehrungsfähigen Phagen aus einem Bakterium, das mit inaktivierten, also allein nicht mehr vermehrungsfähigen Phagen mehrfach infiziert war. LURIA konnte 1947 für UV-inaktivierte T2, T4 und T6 sowie auch für T5 eine Multiplizitätsreaktivierung nachweisen.

In den entsprechenden Versuchen mit protamininaktivierten T5-Phagen wurde das Verhältnis von Phagen zu Bakterien zwischen 0,1 und 5 variiert. Eine Erhöhung des Überlebendentiters und damit eine Multiplizitätsreaktivierung konnte jedoch nie festgestellt werden. Dieser Befund spricht jedoch noch nicht gegen eine Injektion, denn es könnte durch Protamin an jedem Phagen die gleiche Schädigung hervorgerufen werden, die es unmöglich macht, daß sich mehrere Untereinheiten von inaktivierten Phagen im Bakterieninnern wieder zu einem normalen, aktiven Phagen ergänzen können.

2. Elektronenmikroskopische Darstellung der Injektion

Beim Phagen T2 lassen sich nach der Injektion an einem Bakterium gut leere Phagenhüllen feststellen, die ihre DNS schon injiziert haben

und deshalb kontrastärmer, d. h. leer gegenüber normalen Phagen erscheinen. Während der elektronenmikroskopischen Adsorptionsuntersuchungen wurde gleichzeitig nach leeren T5-Hüllen an den Bakterien gesucht. Solche Hüllen konnten jedoch auch in den Kontrollen nur sehr unsicher und unregelmäßig festgestellt werden. Es scheint so, als würde die DNS von T5 ausnahmsweise schon durch mechanische Einflüsse bei der Präparation freigesetzt, so daß die — selten beobachteten — leeren Hüllen von inaktivierten T5 an *E. coli* B nicht als Beweis für eine normale Injektion dienen können.

3. Interferenz (Zusammenarbeit mit überinfizierenden Phagen)

Infiziert man ein Bakterium in kurzem Abstand nacheinander mit zwei verschiedenen Phagen, die serologisch nicht verwandt sind, dann vermehrt sich nur der eine Phage, während die Vermehrung des anderen unterdrückt wird. Die Vermehrung der DNS des nachinfizierenden Phagen wird also durch die Vermehrung des ersten verhindert.

a) Verwendung von inaktiviertem T5 und einem virulenten Phagen

Verwendet man als ersten Phagen einen inaktivierten T5 und infiziert anschließend mit dem Phagen T7 nach, dann müßte am Verhalten dieses zweiten Phagen festzustellen sein, ob die injizierte DNS des inaktivierten T5 noch einen Einfluß auf den Bakterienstoffwechsel ausüben und dadurch die Vermehrung des T7 unterdrücken kann.

Da T5 sehr langsam adsorbiert, wurden zur Beschleunigung der Adsorption die Bakterien jeweils nur in $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens aufgenommen.

Zunächst wurden die gleichen Mengen Bakterien ($4 \cdot 10^9$ /ml) für die Erstinfektion in den Kontrollen mit aktiven T5 und in den Versuchsröhrchen mit inaktivierten T5 angesetzt und für die Zweitinfektion zu beiden Röhrchen die gleichen Mengen T7 gegeben. Die Ergebnisse waren jedoch bei dieser Versuchsanordnung nicht eindeutig; durch die schlechte Adsorption von T5 an *E. coli* B waren in den Kontrollen immer noch uninfilzierte Bakterien vorhanden, in denen sich dann T7 vermehren konnte, ohne von T5 unterdrückt zu werden. Deshalb wurden die Ansätze geändert: zu gleichen Mengen Bakterien kam als Kontrolle ein bestimmtes Volumen Puffer, in das Versuchsröhrchen jedoch inaktivierte T5. Hätten die inaktivierten Phagen ihre Fähigkeit zur Interferenz verloren, dann müßte sich in Kontroll- und Versuchsröhrchen T7 in gleicher Weise vermehren können. Zur Prüfung auf eine „Selbstinterferenz“, welche LURIA (1947) bei T2 fand, wurde der Versuch insofern abgewandelt, als zur Zweitinfektion unbehandelte T5 zugegeben wurden. Hierbei mußte das Verhältnis Bakterien:Inaktivierungsgemisch so gewählt werden, daß die später zugegebenen unbehandelten T5 von dem vorhandenen Protamin nicht mehr inaktiviert wurden.

Die Ergebnisse der Interferenzversuche sind aus Tab. 4 zu entnehmen. Aus den Daten der Tab. 4 ist zu schließen, daß der inaktivierte T5 weder die Vermehrung von T7 noch die Vermehrung von T5 im gleichen Bakterium verhindert, also weder Fremd- noch Selbstinterferenz verursacht.

Tabelle 4
Einwirkung von inaktivierten T5 auf die Vermehrung eines nachinfizierenden Phagen
a) T7; b) T5

T5-Überlebende nach Protamin- behandlung	Erstinfektion mit	Zweitinfektion mit	Kontrolle	Versuch
$3,5 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^9$ inaktiv. T5	$2 \cdot 10^7$ T7	$1,6 \cdot 10^9$ T7	$1,9 \cdot 10^9$ T7
$2,9 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^9$ inaktiv. T5	$8 \cdot 10^8$ T5	$7,4 \cdot 10^8$ T5	$5,8 \cdot 10^8$ T5

b) Verwendung des Systems *E. coli* K12 (λ) + T5

WEIGLE u. DELBRÜCK beschrieben 1951 die Interferenz zwischen einem temperierten Phagen, (λ), und einem virulenten Phagen (T5), wobei sich λ als Prophage in seinem Wirtsbakterium *E. coli* K12 (λ) befand. Induziert man in dem Bakterium K12 (λ) durch milde UV-Bestrahlung das Freisetzen des Phagen λ und infiziert in nicht zu kurzem Abstand (z. B. 37 min nach der Bestrahlung) mit T5 nach, dann wird das Auftreten freier λ -Phagen verhindert, obwohl sich zum Zeitpunkt der Zweitinfektion in fast 100% der Bakterien bereits λ -Phagen in Vermehrung befinden.

Die gewaschenen Bakterien wurden in Puffer bis zu einer Dichte von ungefähr $1 \cdot 10^8$ Bakterien/ml resuspendiert und mit einer OSRAM-HNS Hg-Niederdrucklampe 80 sec lang in 31,5 cm Abstand bestrahlt. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugieren sedimentiert, zur besseren Adsorption ebenfalls nur in ein Zehntel des ursprünglichen Volumens Bouillon aufgenommen und bis zur Zweitinfektion bei 37° C gehalten. 37 min nach der Bestrahlung wurden die Bakterien in drei Röhrchen verteilt: dem ersten wurde als Kontrolle Puffer zugesetzt, dem zweiten aktive T5 und dem dritten die gleiche Anzahl inaktivierter T5. Zur Adsorption von T5 an die bestrahlten Bakterien blieben die Ansätze weitere 15 min bei 37° C und wurden dann sofort ausgeplattet, noch bevor — 60 min nach der Bestrahlung — aus den Bakterien, die nicht mit T5 infiziert waren, λ freigesetzt werden konnte. Als Indicator wurde *E. coli* K12 (s) verwendet und in den drei Ansätzen jeweils nur die induzierten λ verglichen. — Vorversuche hatten ergeben, daß weder λ als freier Phage noch K12 (λ) durch die verwendete Protaminkonzentration geschädigt wird.

Gegenüber der Pufferkontrolle betrug die Ausbeute an λ bei Nachinfektion mit aktiven T5 nur etwa 1%, während die Anzahl λ durch inaktivierte T5 bei ungefähr 85% der Kontrolle lag.

Bei dieser Versuchsanordnung wird — wie bei WEIGLE u. DELBRÜCK (1951) — durch Nachinfektion mit T5 die Induktion in einem

Spätstadium unterbrochen, nämlich zu einem Zeitpunkt, zu dem sich in allen bestrahlten *K 12* (λ) Bakterien bereits λ -Phagen befinden.

In Abwandlung der Versuche von WEIGLE u. DELBRÜCK wurde *K 12* (λ) zuerst mit T5 infiziert, und dann erst die Komplexe zu verschiedenen Zeiten nach der Phagenzugabe mit UV bestrahlt. Es sollte also untersucht werden, ob T5 bereits den Beginn der Induktion unterbrechen kann.

Die drei Parallelansätze (mit Puffer, aktiven T5 und inaktivierten T5) wurden jeweils in zwei Teile geteilt; die erste Hälfte wurde 10 min, die zweite Hälfte 20 min nach der Zugabe von T5 bestrahlt, nachdem sie mit Puffer auf die entsprechende Konzentration verdünnt worden war.

Die Ergebnisse dieser beiden Versuche sind in Tab. 5 dargestellt. Bei diesem Versuch lag die Überlebensrate von T5 nach der Protaminbehandlung nur bei $5,8 \cdot 10^{-3}$, der Überlebens-titer betrug immer noch $3,4 \cdot 10^6$ aktive T5/ml.

Tabelle 5. *Einwirkung von aktivem T5 und inaktiviertem T5 auf die Induktion von λ aus K12 (λ)*

Titer der <i>K 12</i> (λ)- Bakterien	darin spontan λ enthalten	[<i>K 12</i> (λ) + UV] + Puffer	[<i>K 12</i> (λ) + UV] + aktive T5	[<i>K 12</i> (λ) + UV] + inaktive T5
$2,1 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^5$	$3,56 \cdot 10^8$ = 100%	$4,2 \cdot 10^6$ = 1,18%	$3,0 \cdot 10^8$ = 84,3%
		<i>K 12</i> (λ) + Puffer + UV	<i>K 12</i> (λ) + aktive T5 + UV	<i>K 12</i> (λ) + inaktive T5 + UV
UV 10 min nach T5-Zugabe		$1,01 \cdot 10^8$ = 100%	$2,3 \cdot 10^6$ = 2,27%	$7,3 \cdot 10^7$ = 72,5%
UV 20 min nach T5-Zugabe		$1,05 \cdot 10^8$ = 100%	$1,3 \cdot 10^6$ = 1,24%	$6,01 \cdot 10^7$ = 57,5%

Während auch bei dieser Versuchsanordnung aktive T5 die Induktion von λ verhindern können, bleiben die inaktivierten T5 ohne größeren Einfluß auf den Ablauf der Induktion. Die inaktivierten, adsorbierten T5 können also die λ -Induktion weder zu ihrem Beginn noch in einem Spätstadium beeinflussen. Falls also noch DNS injiziert wird, so ist diese inaktiv sowohl hinsichtlich Interferenz wie auch Reaktivierung bei multipler Infektion.

III. Besprechung der Ergebnisse

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und Adsorptionsversuche konnte gezeigt werden, daß die inaktivierten T5 noch an *E. coli* B adsorbiert werden. Damit ist bewiesen, daß die Protaminschädigung nicht, wie zuerst vermutet (SIEFERT-GRETCHMAN u. KAPLAN 1958), in einer Blockierung der Adsorption besteht. Auch bei anderen

Arten der Inaktivierung von Phagen ist die Adsorption nicht gehemmt, z. B. bei UV — (LURIA u. DELBRÜCK 1943) und Röntgenstrahlen-Inaktivierung von T2 (WATSON 1950).

Eine Tötung von *E. coli* B durch die adsorbierten, inaktivierten T5 findet bei niedrigen Phagenkonzentrationen nicht mehr statt. Nur bei Verwendung von hohen Multiplizitäten (über $m = 10$) kann man ein leichtes Absinken der Koloniebildung beobachten. Hierbei liegt aber vielleicht schon eine „lysis from without“ vor. Inaktiviert man T2 durch Hitze z. B. von 10^{10} auf 10^3 Überlebende (LURIA u. DELBRÜCK 1943), dann wird zugleich mit der Vermehrungsfähigkeit auch die Fähigkeit zum Töten des Wirtes zerstört. Bei UV-inaktivierten T2 und T5 (WATSON 1950) wurde beobachtet, daß die Phagen ihre Wirtsbakterien mit größerer Wirksamkeit abtöten als unbehandelte Phagen.

Ein Drittel aller röntgenstrahleninaktivierten T2 können den Wirt noch töten.

Da durch Protamin inaktivierte T5-Phagen in infizierten Bakterien nicht oder kaum töten, ist es ausgeschlossen, daß die starke Senkung des Plaquetiters durch Protamin auf Tötung der infizierten Bakterien beruht. Die inaktivierten Phagen haben also ihre Vermehrungsfähigkeit verloren.

Reaktivierung durch Trypsin. Falls Protamin zur Inaktivierung irgendwie in den Phagen eindringt, dann sollte man bei Trypsinzugabe um so mehr reaktivierbare T5 finden, je früher man die Protamineinwirkung abbricht. Dies ist aber nicht der Fall. Aus Tab. 3 geht hervor, daß man nach 5 min noch keine, sondern erst nach 15 bzw. 30 min eine gewisse Reaktivierung feststellen kann. Daraus kann man schließen, daß die eigentliche Inaktivierung schon nach 5 min abgeschlossen ist und auch durch Trypsin nicht mehr revertiert werden kann. In früheren Versuchen konnte durch Zusatz von Gummi arabicum die anfänglich schnelle Inaktivierung in zwei Teilprozesse aufgegliedert werden: in eine sehr schnelle, die den Hauptteil der Inaktivierten ausmacht, und in eine etwas langsamere Reaktion, durch die nur noch ein geringer Bruchteil Phagen inaktiviert wird. Die Ergebnisse der Trypsinversuche legen es nun nahe, anzunehmen, daß nur diese letzte Art der Inaktivierung durch Trypsin reaktiviert werden kann, während der Hauptteil der inaktivierten T5 durch Trypsin unbeeinflusst bleibt. Auch aus den Versuchen mit Trypsin läßt sich demnach auf zwei Schritte der Inaktivierung durch Protamin schließen.

Multiplizitätsreaktivierung konnte für protamininaktivierte T5 nicht gezeigt werden.

Interferenz der inaktivierten T5 konnte weder für einen virulenten Phagen (T7) noch für einen temperierten Phagen (λ) nachgewiesen werden. In beiden Fällen blieb die Vermehrung des zweiten Phagen durch eine Erstinfektion mit inaktiviertem T5 unbeeinflusst.

Auch eine „Selbstinterferenz“, wie sie LURIA u. DELBRÜCK 1943 für das Wachstum von normalen T2 durch UV-inaktivierte T2 beschrieben, liegt bei inaktiviertem + unbehandeltem T5 nicht vor.

Es ist also bei T5 durch die Einwirkung von Protamin außer der Vermehrungsfähigkeit auch die Fähigkeit zur Tötung des Wirtes und zur Interferenz zerstört worden.

Nach WATSON (1950) können bei röntgenstrahleninaktivierten T2 zunächst noch ein Drittel aller Partikel die Wirtszellen töten; mit steigender Dosis wird aber dann auch die Tötungs- und Interferenzfähigkeit gleichzeitig zerstört.

Aus den kinetischen Untersuchungen der Inaktivierung durch Protamin wurde zunächst angenommen, daß der Inaktivierungsprozeß durch Protamin Ähnlichkeit mit der Kinetik der Adsorption hat; daraus wurde auf eine mögliche Hemmung der Adsorption durch Protamin geschlossen (SIEFERT-GRETCHMAN u. KAPLAN 1958). Die vorliegenden Versuche haben jedoch bewiesen, daß die Adsorption durch Protamin nicht gestört wird und daß die Wirtszelle nicht getötet wird, daß aber auch eine wirksame Injektion der Phagen-DNS nicht mehr stattfindet. Der Inaktivierungseffekt dürfte demnach zwischen den Stadien der Adsorption und der Injektion eingreifen, also wahrscheinlich die Penetration betreffen.

Die Penetration, durch die der Weg für die Phagen-DNS aus dem Phagenkopf und durch die Bakterienmembran eröffnet wird, wird durch ein Enzym bewirkt, das an der Schwanzspitze des Phagen lokalisiert ist (BROWN u. KOZLOFF 1957). Nach DUKES u. KOZLOFF (1959) ist dieses Enzym jeweils für T2, T4 und T5 spezifisch; es besitzt Phosphataseaktivität und wird (bei T2 und T4) durch Einfrieren und Wiederauftauen der Phagenpartikel in seiner Wirksamkeit erhöht. Im Zusammenhang mit der notwendigen Anwesenheit von Ca^{++} für die Penetration der T5-DNS in den Wirt — und aus der Tatsache, daß Ca -Ionen die Kontraktion von Myosin stimulieren — schließen die Autoren, daß Ca^{++} eine ähnliche Funktion bei T5 ausübt und die Phosphatase aktiviert. Sie vermuten, daß das kontraktile Schwanzprotein und die Phosphatase identisch sind und daß sie bei der Überführung der Phagen-DNS aus dem Phageninnern durch den Phagenschwanz in das Wirtsbakterium mitwirken. Dies gilt besonders für T5, bei dem durch seinen langen, dünnen Schwanz die Passage der DNS erschwert sein könnte.

BRUMFITT konnte 1960 an *Micrococcus lysodeicticus* nachweisen, daß die Lysozymresistenz einer Mutante auf einer Acetylierung der Hydroxylgruppen der Zellwand beruht. Diese Mutante ist gleichzeitig resistent gegen Bakteriophagen, die den Ausgangsstamm lysieren. Durch die Veränderung der Zellwand verliert das Phagenenzym seine spezifische Wirkung. — Aus dem Vergleich der Eigenschaften des Phagenenzym

mit denen des Eiweißlysozyms schließt BRUMFITT, daß das von ihm untersuchte Phagenenzym ein „Phagen-Lysozym“ sei. KOCH u. DREYER isolierten 1958 aus dem Phagen T2 ein Enzym, das sie ebenfalls als „Phagen-Lysozym“ bezeichnen.

Nimmt man nun an, daß Protamin an diesem Phagenenzym angreift, dann ergeben sich hierfür zwei Möglichkeiten:

1. Protamin und Enzym reagieren derart miteinander, daß dieses seine spezifische Wirkung verliert, z. B. durch Abdeckung oder Zerstörung der Wirkgruppen.

2. Lysozym wie Protamin sind basische Proteine. Es wäre denkbar, daß das stärker basische Protamin das schwächer basische Phagenenzym von seinem Substrat verdrängt.

Die gefundene geringe Reaktivierung durch Trypsin könnte auf einem Wegverdauen des die Wirkgruppe bedeckenden oder mit dem Phagenenzym konkurrierenden Protamins beruhen. Daß jedoch der größte Teil der Inaktivierung durch Trypsin nicht reversibel ist, spricht für eine irreversible Zerstörung der Wirkgruppe des Penetrationsapparates, z. B. des Phagenlysozyms.

Da von den Phagen der T-Reihe nur T1 und T5 inaktiviert werden, müßte bei beiden Phagen eine für sie spezifische Struktur, z. B. am Phagenenzym, vorhanden sein, die durch Protamin besetzt wird.

Summary

1. The inactivated T5-phages are still adsorbed to their host cells.

2. Together with the reproducing ability, most of the inactivated phage particles lose their ability to kill the host cell. Thus the strong decrease of the phage titer after addition of protamine is not due to killing of the bacteria which are infected by protamine-treated phages.

3. The greatest part of inactivated T5 is not affected by addition of trypsin; only a very small fraction can be reactivated. These phages are probably identical with those particles of the phage population which were found earlier to be inactivated only very slowly by protamine. It is in favour of this proposal that the reactivation effect can only be demonstrated if protamine could react more than five minutes with T5 — a time, when "saturation level" of inactivation is almost reached.

4. Injection of "effective DNA" could not be shown. There was

- a) no multiplicity reactivation

- b) no mutual exclusion between T7 and inactivated T5 and no self-interference of inactivated T5 and active T5

- c) The induction of phage λ by UV radiation of *E. coli* K12(λ) could not be affected by inactivated T5 in the beginning or at the end of induction period. At these stages of its development phage λ is strongly inhibited by the addition of active T5.

From these experiments it may be concluded, that protamine inhibits the penetration of DNA into the host cell, probably by altering the tail enzyme of the phage.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium und eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. R. W. KAPLAN bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut sowie für anregende Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

- ADAMS, M. H.: Methods of study of bacterial viruses in „Methods in Medical Research“. Chicago: The Year Book Publishers, Inc. 1950.
- BROWN, D. D., and L. M. KOZLOFF: Morphological localization of the bacteriophage tail enzyme. *J. biol. Chem.* **225**, 1—11 (1957).
- BRUMFITT, W.: Studies on the mechanism of adsorption and penetration by bacteriophage. *J. Path. Bact.* **79**, 1—9 (1960).
- DUKES, P. P., and L. M. KOZLOFF: Phosphatases in bacteriophages T2, T4 and T5. *J. biol. Chem.* **234**, 534—538 (1959).
- FISCHER, H., u. H. BRANDIS: Zur Wirkung basischer Proteine auf Bakteriophagen und Bakterien. *Naturwissenschaften* **41**, 533 (1954).
- GRETCHMAN, G., H. BRANDIS, H. FISCHER u. W. LIPPERT: Zur Wirkungsweise basischer Proteine auf Bakteriophagen. *Schweiz. Z. allg. Path.* **20**, 322—329 (1957).
- KELLENBERGER, G., u. E. KELLENBERGER: La lysogénie d'une souche *Bacillus cereus* mise en évidence par le microscope électronique. *Schweiz. Z. allg. Path.* **15**, 225—233 (1952).
- KLECZKOWSKI, J., and A. KLECZKOWSKI: Effects of clupein and its degradation products on a rhizobium bacteriophage, on its host bacterium and on the interaction between the two. *J. gen. Microbiol.* **14**, 449—459 (1956).
- KOCH, G., and W. J. DREYER: Characterization of an enzyme of phage T2 as a lysozyme. *Virology* **6**, 291—293 (1958).
- LURIA, S. E., and M. DELBRÜCK: Interference between inactivated bacterial virus and active virus of the same strain and of a different strain. *Arch. Biochem.* **1**, 207—218 (1943).
- LURIA, S. E.: Reactivation of irradiated bacteriophage by transfer of self-reproducing units. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **33**, 253—264 (1947).
- SIEFERT-GRETCHMAN, G., u. R. W. KAPLAN: Untersuchungen zur Kinetik der Inaktivierung der Coliphagen T1 und T5 durch Protamin. *Arch. Mikrobiol.* **30**, 363—382 (1958).
- WATSON, J. D.: The properties of X-ray inactivated bacteriophage. *J. Bact.* **60**, 697—718 (1950).
- WEIDEL, W., and E. KELLENBERGER: The *E. coli* B-receptor for the phage T5. *Biochim. biophys. Acta* **17**, 1—9 (1955).
- WEIGLE, J. J., and M. DELBRÜCK: Mutual exclusion between an infecting phage and a carried phage. *J. Bact.* **62**, 301—318 (1951).

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena

Chemisch-Physiologische Untersuchungen über die Hydroxylierung von Steroiden durch Pilze der Gattung *Curvularia* ** ***

Von

KLAUS ZETSCHKE *

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. August 1960)

A. Problemstellung

In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten über mikrobielle Hydroxylierungen von Steroiden erschienen. Als erste berichteten KRAMLI u. HORVATH (1948 und 1949) über die Hydroxylierung von Cholesterin in 7 α -Stellung durch *Proactinomyces roseus* (*Nocardia*). Diese Arbeit fand indessen nur wenig Beachtung. Erst die Entdeckung von PETERSON u. MURRAY (1952), daß Pilze der Gattung *Rhizopus* Steroide in 11-Stellung hydroxylieren können, erregte allgemeine Aufmerksamkeit und löste zahlreiche weitere Untersuchungen auf diesem Gebiete aus. In der Folgezeit wurden zahlreiche Mikroorganismen, vorwiegend Pilze, aber auch Actinomyceten und Bakterien auf ihre Fähigkeit, Steroide zu hydroxylieren, überprüft. Man fand, daß eine große Anzahl von Mikroorganismen — besonders Pilze — in dieser Hinsicht aktiv sind. Heute ist es praktisch möglich, alle Kohlenstoffatome des Steroidgrundgerüsts — außer den Atomen 4,5 und 18 — mit Hilfe von Mikroorganismen spezifisch zu hydroxylieren.

Außerdem wurden Hydrierungen, Dehydrierungen, Seitenkettenabbau, Ringerweiterungen (Ring D), Ringsprengungen und Kombinationen dieser Reaktionen beobachtet. Sehr gute Zusammenfassungen und Übersichten über die vorliegenden Arbeiten, die verwendeten Methoden und die technische Anwendung dieser Reaktionen findet man bei PETERSON (1953, 1955, 1956), FLOREY (1954), FINCH (1954, 1955), HANC u. RIEDEL-TUMOVA (1954), FRIED u. a. (1955), WETTSTEIN (1955), EPPSTEIN u. a. (1956) sowie VISCHER u. WETTSTEIN (1957, 1958).

* Jetzige Adresse: Physiol.-chem. Institut der Universität Rostock, Rostock, Leninallee 70.

** Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock.

*** Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. v. GUTENBERG zum 80. Geburtstag.

Alle diese Arbeiten befassen sich aber hauptsächlich mit der chemischen Seite des Problems, d. h. mit der Isolierung und Struktur- aufklärung der erhaltenen Umsetzungsprodukte. Dagegen liegen über die biologische und die physiologische Seite dieser mikrobiellen Steroid- oxydationen erst recht wenige zuverlässige Arbeiten vor. Verschiedene Autoren verfolgten den zeitlichen Verlauf der Steroidhydroxylierung, um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt die maximale Ausbeute an dem gewünschten Produkt erhalten wird (DULANEY, STAPLEY u. HLAVAC 1953; KAROW u. PETSIAS 1956). O'CONNELL u. DULANEY untersuchten den Einfluß, den verschiedene Kohlenstoffquellen und dem Nährboden zugesetzte Alkohole, Phenole und Lipide auf die Hydroxylierung haben.

Weit gehen die Ansichten der verschiedenen Autoren in der wichtigen Frage auseinander, ob die für die Steroidhydroxylierung verantwort- lichen Enzyme adaptiv gebildet werden oder nicht. Während DULANEY (1955), RUBIN u. a. (1956) sowie PERLMAN u. a. (1957) für ihre Objekte adaptive Bildung der Steroidhydroxylasen annehmen, vertreten ZAFFARONI (1955) und PETERSON (1955) die entgegengesetzte Meinung.

Auch über den Ort der Steroidhydroxylierung gehen die Auffassungen weit auseinander. Während einige Autoren eine extracelluläre Hydroxy- lierung annehmen (PETERSON 1952, BOURGAIN 1956), muß man aus den Ergebnissen anderer Autoren auf eine intracelluläre Hydroxylierung schließen (SHULL u. KITA 1955).

Über den Mechanismus der mikrobiellen Steroidhydroxylierung und die Natur der daran beteiligten Enzyme ist bisher nur wenig bekannt geworden. Durch die Arbeiten von HAYANO (1956), BLOOM u. a. (1956), SWEAT u. a. (1956) wurde bewiesen, daß bei der Hydroxylierung aus- schließlich molekularer Sauerstoff verwendet wird. Daraus geht hervor, daß die mikrobielle Steroidhydroxylierung nicht über eine Dehydrierung mit nachfolgender Wasseranlagerung erfolgen kann (siehe auch Dis- kussion).

Steroidhydroxylasen kommen bei einer ganzen Reihe von Organismen vor. Bei den Säugetieren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Bio- synthese der Nebennierenrindenhormone und der Gallensäuren. Über die Hydroxylierung von Steroiden in der Nebennierenrinde (NNR) liegen bereits eine ganze Anzahl von guten Untersuchungen vor. (Zu- sammenfassungen bei HAYANO u. a. 1956.) Auch bei der Bildung der steroiden Krötengifte ist die Teilnahme von Steroidhydroxylasen wahr- scheinlich. Im Pflanzenreich kommen Steroidhydroxylasen nicht nur bei den Mikroorganismen vor, sondern man muß annehmen, daß im Bereich der höheren Pflanzen Steroidhydroxylasen bei der Synthese der steroiden Herzgifte (z. B. Digitalisglykoside) und verschiedener Steroidsapogenine eine Rolle spielen.

Als Versuchsobjekt für unsere Untersuchungen verwendeten wir Pilze der Gattung *Curvularia*. Aus der Literatur ist bekannt, daß *Curvularia*-Arten Steroide unter anderem in 7 α , 11 β , 14 α und 21-Stellung hydroxylieren können (MEYSTRE 1955; AGNELLO u. a. 1955; SHULL u. KITA 1955; RUBIN 1956). Diese Hydroxylierungen ergeben Parallelen zu den oben genannten Fällen und daher interessante Vergleichsmöglichkeiten. Die 11 β - und 21-Hydroxylierung spielt eine große Rolle bei der Biosynthese der NNR-Hormone. 7 α -Hydroxylierungen kommen bei der Synthese der Gallensäuren und verschiedener Polyoxysteroiden der Galle vor. Die meisten Herzgifte besitzen in 14 β -Stellung eine Hydroxylgruppe. (Allerdings zeigen die Herzgifte eine andere Ringverknüpfung als die von uns als Substrat verwendeten Steroide.)

B. Material und Methoden

I. Die Pilzstämme

Als Versuchsobjekte verwendete ich Arten und Stämme der Pilzgattung *Curvularia* (*Moniliales*). Die Gattung wurde zuerst von BOEDIJN (1933) aufgestellt. Aus verschiedenen Pilzsammlungen und Instituten konnten wir 15 verschiedene Arten und Stämme zusammenbringen (Tab. 1, S. 244). Die Stämme wurden in unserer Pilzsammlung in Schrägagarröhrchen auf Bierwürze- oder Malzagar kultiviert. Impfmaterial, das wir für unsere Versuche benötigten, wurde nur von jungen Kulturen — Höchstalter zehn Tage — entnommen.

II. Die Reagentien

Alle Reagentien wurden in den Reinheitsgraden p. a. oder reinst verwendet oder entsprachen den Anforderungen des DAB. Die als Substrate verwendeten Steroide stammten aus der Produktion des VEB Jenapharm oder wurden eigens für diese Versuchszwecke hergestellt. Alle verwendeten Glasgeräte bestanden aus Schottischem Gerätéglass oder Rasothermglas. Zur Schmelzpunktbestimmung wurde ein Mikroschmelzpunktapparat nach Böetius verwendet, zur Bestimmung der Drehwerte das Kreispolarimeter nach Lippich.

Die UV-Absorptionsmessungen wurden mit dem Zeißschen Universal-Spektrophotometer vorgenommen. Genaue pH-Messungen wurden mit der Jenaer Glaselektrodenmeßkette 9479 (Schott) und dem pH-Meßverstärker MV 11 von Clamann-Grahner durchgeführt.

III. Die Versuchsanordnung

1. Die Pilzkultur

Alle Versuche wurden grundsätzlich mit Submerskulturen der Pilze ausgeführt. Die submerse Kultur des Pilzmycels erfolgte auf zweierlei Art: a) in Schüttelkulturen, b) in Durchlüftungskulturen.

a) Bei den Schüttelkulturen wurden 500 ml Standkolben verwendet, die mit 100 ml Nährlösung gefüllt und mit Wattestopfen verschlossen wurden. Sterilisiert wurde normalerweise $\frac{1}{2}$ Std bei 125° C. Nach dem Abkühlen wurden die Kolben entweder mit einer Impfpöse Pilzmycel oder einer Sporensuspension der Stammkultur beimpft. Die beimpften Schüttelkolben wurden auf eine Rotationsschüttelmaschine gebracht (Ausschlag: 15 cm, Umgänge: 220/min) und bei 28° \pm 1° C bebrütet. Nach 48–72stündiger Kultur hatte sich normalerweise in den Schüttelkolben reichlich Mycel gebildet, so daß die Kulturen zu Versuchszwecken

verwendet werden konnten. Die als Substrate verwendeten Steroide wurden den Schüttelkolben unter Einhaltung steriler Bedingungen in Methanol oder Aceton gelöst, zugesetzt. Normalerweise wurden je Schüttelkolben, d. h. je 100 ml Nährlösung, 25 mg oder 50 mg Steroid — in 2 ml Lösungsmittel gelöst — zugegeben. Die Einwirkungszeit der Pilzkulturen auf die Steroide betrug in der Regel 24 Std. Danach erfolgte die Aufarbeitung der Kolben.

b) Die präparative Gewinnung der hydroxylierten Steroide wurde mit Durchlüftungskulturen vorgenommen. Dazu wurden Glasgefäße mit 6 l Inhalt (Schott, Sulfierkolben) verwendet, die mit 4 l Nährlösung beschickt wurden. Die Nährlösung wurde durch eine G4-Glasfritte (zur besseren Verteilung) mit steriler Luft (Kohlenfilter) belüftet (100 l/Std) und mit 320 Umdrehungen je Minute gerührt. Beimpft wurden diese Gefäße mit einem oder zwei gut bewachsenen Schüttelkolben. Der in solchen Kulturen unter Umständen auftretende Schaum wurde mit Antischaummittel (Octadecanol in Sojaöl) bekämpft. Nach 24—48ständiger Kulturdauer hatte sich normalerweise reichlich Mycel entwickelt, so daß das Steroidsubstrat zugesetzt werden konnte. In der Regel wurden je Gefäß 1 oder 2 g Steroid, in 25 ml Methanol oder Aceton gelöst, zugegeben. Nach 48ständiger Einwirkungszeit wurden die Versuche gewöhnlich abgebaut und aufgearbeitet.

2. Die Aufarbeitung

Durch Absaugen über eine Glasfilterfritte (G 1 oder 2) wurde als erstes das Mycel von der Kulturlösung getrennt. Danach wurden die Schüttelkolben dreimal mit Methylenchlorid ausgespült und das Mycel ebenfalls dreimal mit Methylenchlorid gewaschen. Dieses Methylenchlorid wurde mit dem Kulturfiltrat vereinigt. Im Mycel sind nach dieser Prozedur nur noch geringe Steroidmengen vorhanden, und zwar unter 1%. Das Kulturfiltrat schüttelten wir viermal mit dem halben Volumen Methylenchlorid aus. Die Extrakte wurden vereinigt, mit wenig Natriumsulfat getrocknet und im Vacuum (Wasserstrahlpumpe) unter mäßigem Erwärmen eingedampft. Der zur Trockne eingedampfte Extrakt wurde mit 2 ml Methanol aufgenommen und war so für die Papierchromatographie fertig.

Die Aufarbeitung der präparativen Ansätze erfolgte im Prinzip in der gleichen Weise, nur daß man hier nach dem Abdampfen des Methylenchlorids einen öligen bzw. fettigen Rückstand erhält.

3. Die Auftrennung der Extrakte

Die Extrakte enthalten in der Regel Steroidgemische und außerdem noch Verunreinigungen, die vom Pilzmycel stammen. Es ist daher notwendig, vor der quantitativen Bestimmung der einzelnen Steroide bzw. ihrer präparativen Reindarstellung, die nichtsteroiden Verunreinigungen abzutrennen und die Gemische in ihre Komponenten zu zerlegen. Am einfachsten und sichersten gelingt das mittels Säulenchromatographie und Papierchromatographie.

a) Säulenchromatographie

Zur präparativen Auftrennung von Steroidgemischen benutzten wir die Adsorptionschromatographie an Silicagelsäulen. Die Silicagelsäulen wurden in üblicher Weise präpariert (HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, R. NEHER 1958). Der Extrakt wurde in Chloroform gelöst auf die Säule gegeben. Eluiert wurde mit Chloroform-Aceton-Gemischen. Beginnend mit reinem Chloroform wurde der Acetonanteil bei jeder Fraktion um 2,5% gesteigert. Jede Fraktion bestand normalerweise aus 200 ml Lösungsmittelgemisch. Das Eluat wurde in kleinen Rundkolben (40 ml) aufgefangen und die Lösungsmittel unter Vacuum abgedampft, wobei die eluierten Substanzen als Rückstand in den Kölbchen sichtbar wurden.

Die Steroide ließen sich in den meisten Fällen gut zum Kristallisieren bringen. Durch papierchromatographische Analyse, nach dem Schmelzpunkt und nach der Kristallform wurde festgestellt, welche Kölbchen die gleiche Substanz enthielten. Der Inhalt dieser Kölbchen wurde vereinigt und in Aceton, Methanol oder Essigester umkristallisiert.

Durch die Adsorptionschromatographie kann man in der Regel allerdings nur Steroide einwandfrei trennen, die sich in der Zahl der Sauerstofffunktionen unterscheiden. Steroide, die die gleiche Zahl von Sauerstofffunktionen tragen, nur in verschiedenen Positionen, lassen sich auf diese Weise nur schwierig trennen. Hier half uns jedoch in den meisten Fällen die Verteilungschromatographie weiter. Mit gleichem Erfolg verwendeten wir dazu die Verteilungschromatographie an Cellulosepulversäulen nach DIRSCHERL (1956) und die Verteilungschromatographie an Silicagelsäulen nach KATZENELLENBOGEN u. a. Die weitere Aufarbeitung wurde wie bei der Adsorptionschromatographie vorgenommen. Kleinere Mengen von Steroidgemischen trennten wir auch durch präparative Papierchromatographie (HAINES u. KARNEMAAT).

b) Papierchromatographie

Die qualitative Papierchromatographie wurde im Prinzip ebenso durchgeführt wie die unter 4a beschriebene quantitative.

4. Die quantitative Bestimmung der Steroide

Die physiologischen Untersuchungen führten wir aus verschiedenen Gründen (gute Reproduzierbarkeit, geringster Arbeits- und Materialaufwand und andere) hauptsächlich in Schüttelkolbenversuchen durch. Zur quantitativen Auswertung dieser Versuche benötigten wir daher eine Methode, die es gestattete, relativ kleine Mengen von Steroidgemischen in die einzelnen Komponenten zu trennen und diese zuverlässig quantitativ zu bestimmen. Wir arbeiteten für unsere Zwecke folgende Methode aus, die es auch erlaubt, größere Serienversuche quantitativ auszuwerten.

Die Aufarbeitung der Schüttelkolben erfolgte wie unter Abschnitt 2 angegeben.

a) Die Auftrennung der Steroidgemische erfolgte papierchromatographisch mit dem System von ZAFFARONI, BURTON u. a. (1950). Filterpapierstreifen (Schl. & Sch. 2043b mgl) wurden mit Propylenglykol getränkt, welches als stationäre Phase dient. Auf den Startpunkten wurden mit Hilfe von Mikropipetten genau 0,02 oder 0,03 ml (entspricht einer Gesamtsteroidmenge von 375 γ bzw. 500 γ) der in 2 ml Methanol gelösten Extrakte (siehe Abschnitt 2) aufgetragen. Entwickelt wurde absteigend mit Toluol. Nach 4–6 Std Laufzeit sind die monohydroxylierten Steroide vom Progesteron, das in der Regel mit der Lösungsmittelfront läuft, und den dihydroxylierten Steroiden, die noch am Startpunkt sitzen, abgetrennt. Die aus dem Pilzmycel stammenden Verunreinigungen laufen entweder mit der Lösungsmittelfront oder bleiben am Startpunkt hängen. Zur Auftrennung der Dihydroxysteroiden benötigte ich maximal 24 Std. Zu diesem Zeitpunkt sind die Monohydroxysteroiden bereits aus dem Chromatogramm herausgewaschen. Daher wurde jeder Extrakt zweimal aufgetragen, der eine Streifen wurde für die quantitative Bestimmung der Monohydroxysteroiden verwendet, der andere, für die der dihydroxylierten Steroide. Im System Propylenglykol-Toluol ist es praktisch nicht möglich, das 11 β -Hydroxyprogesteron vom 14 α -Hydroxyprogesteron abzutrennen. Eine Trennung gelingt aber, wenn man an Stelle von Toluol Ligroin als mobile Phase verwendet, allerdings auch hier erst nach längeren Laufzeiten. Da der Stamm *Curvularia lunata* CII, den ich hauptsächlich für meine Versuche verwendete, nur wenig 14 α -Hydroxyprogesteron bildet, wurde bei der quantitativen Auswertung der Versuche das 14 α -Hydroxyprogesteron nicht gesondert bestimmt, sondern mit

als 11 β -Hydroxyprogesteron angegeben. Da beide Verbindungen in unserem Meßbereich etwa die gleiche Extinktion besitzen (siehe Eichkurven), ist damit praktisch kein Fehler für die quantitativen Angaben verbunden. Zur Auftrennung polarer Steroide sind längere Laufzeiten notwendig. Die Lokalisierung der Steroidflecken auf den Chromatogrammen erfolgte durch die UV-Kontaktphotographie nach HAINES u. DRAKE, (1950; siehe auch ZANDER u. SIMMER 1954). Nachdem die Chromatogramme lufttrocken waren, wurden die Steroidflecken mit Bleistift angezeichnet und ausgeschnitten.

b) Die Steroide wurden aus den Papierstücken mit Methanol eluiert, und die Extinktionen der Eluate im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 242 m μ gemessen.

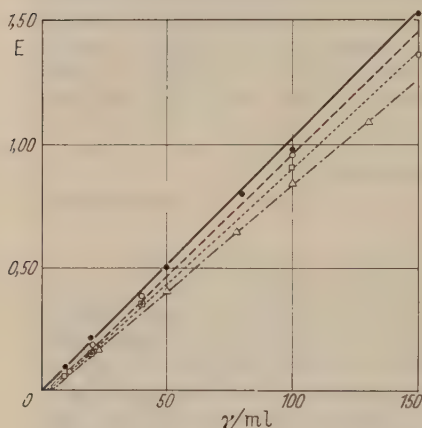


Abb. 1. Eichkurven für ●—● 11 β -Hydroxyprogesteron; ○—○ 14 α -Hydroxyprogesteron; □—□ 7 α , 14 α -Dihydroxyprogesteron; △—△ 11 β , 14 α -Dihydroxyprogesteron. Abszisse: Substanz γ /ml Methanol. Ordinate: Extinktion bei 242 m μ . Schichtdicke 0,204 cm

0,204 cm). Da in dem von mir gemessenen Konzentrationsbereich Proportionalität zwischen Steroidkonzentration und Extinktion besteht (Lambert-Beersches Gesetz; siehe Eichkurven Abb. 1), ist die Extinktion ein relatives Maß für die in den Eluaten vorhandene Steroidkonzentration. Mit Hilfe der Eichkurven kann auch eine Umrechnung in die absoluten Werte erfolgen.

Um die Genauigkeit der Eluierungsmethode zu überprüfen, wurden mehrere Modellversuche angestellt. Sie ergaben, daß die Rückgewinnung aus den Papierchromatogrammen $99 \pm 1\%$ beträgt, diejenige aus Schüttelkulturen $97 \pm 4\%$.

6. Versuchsverrechnung und verwendete Abkürzungen

Die Versuchsergebnisse werden in Extinktion der Eluate angegeben. Da im Meßbereich eine lineare Beziehung zwischen Steroidkonzentration und Extinktion besteht, sind damit die relativen quantitativen Verhältnisse wiedergegeben. Jeder Wert ist das Mittel aus den Meßwerten dreier parallellaufender Versuchskolben. Verschiedene Versuche wurden mit 2×3 parallellaufenden Kolben durchgeführt. Von jedem Versuchsergebnis wurde auf die übliche Art und Weise der mittlere Fehler errechnet. Als signifikant bezeichne ich ein Ergebnis, das sich um mehr als den dreifachen mittleren Fehler von der Kontrolle oder einem anderen Vergleichs-

Die relativ geringe Papierextinktion wurde dadurch ausgeschaltet, daß bei den Messungen Eluate aus gleich großen Papierstücken als Leerwert dienten. Außerdem erfolgte eine Ausschaltung auch dadurch, daß die Kontrollen, auf die die Versuchswerte bezogen wurden, den gleichen Papierfehler aufwiesen.

Die quantitative Eluierung der Steroide erfolgte nach einer Methode, die in Anlehnung an die Progesteronbestimmungsmethode von ZANDER u. SIMMER (1954) entwickelt wurde. Sie ergab recht gute und reproduzierbare Werte.

c) Steroide mit einer $\Delta 4,3$ -Keto-gruppierung zeigen im ultravioletten Bereich des Spektrums starke Absorption mit einem Maximum bei 240 bis 242 m μ . Diese Tatsache wurde zur quantitativen Bestimmung der Steroide benutzt. Die Extinktion der Eluate wurde mit dem Zeißschen Universal-Spektrophotometer gemessen (Schichtdicke

wert unterscheidet (siehe RAUEN). Folgende Abkürzungen wurden gebraucht: NNR = Nebennierenrinde, *Curv. lun.* = *Curvularia lunata*; Prog. = Progesteron; Dihydroxprog. = Dihydroxyprogesteron; Hydroxypr. = Hydroxyprogesteron; DPN = Diphosphopyridinnucleotid; TPN = Triphosphopyridinnucleotid; ATP = Adenosintriphosphat; ÄDTA = Äthylendiamintetraacetat.

C. Versuchsergebnisse

I. Nährbodenversuche

In der Literatur wird als Nährboden für die *Curvularia*-Arten ein Malzextraktnährboden angegeben. Ich versuchte, diese Nährlösung durch eine einfache synthetische zu ersetzen. Es wurden zahlreiche Nährböden geprüft. Dabei ergab sich, daß die *Curvularia*-Arten mit Glucose als Kohlenstoffquelle auskommen und sowohl anorganisch wie auch organisch gebundenen Stickstoff verwerten können. Sie benötigten indessen Wachstumsfaktoren, die im Maisquellwasser vorhanden sind, und die sich nicht durch die gebräuchlichen Vitamine (B₁, B₂, B₆, Nicotinsäureamid, Panthenol und Biotin) ersetzen lassen. Für unsere Versuche verwendeten wir daher — sofern nicht anders vermerkt — den Czapek-Dox Nährboden, dem wir 0,5% Maisquellwasser zusetzten.

II. Die Prüfung der *Curvularia*-Arten und -Stämme auf ihre Ausstattung mit Steroidhydroxylasen

Die Prüfung der verschiedenen *Curvularia*-Arten und -Stämme auf ihre Fähigkeit, Steroide zu hydroxylieren, wurde sowohl in Schüttelkulturen als auch mit Durchlüftungskulturen mit Progesteron als Substrat vorgenommen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die Anordnung und Nummerierung der einzelnen Hydroxylierungsprodukte in der Tabelle mit I, II usw. erfolgte nach der Laufgeschwindigkeit dieser Substanzen im Papierchromatogramm. Ganz links stehen die Substanzen, die am schnellsten laufen, nämlich die Monohydroxyprogesterone, ganz rechts die polarsten Substanzen, die am wenigsten weit vom Startpunkt weg gewandert sind. Progesteron als Ausgangssubstanz ist nicht mit aufgeführt. Die Anzahl der Kreuze ist ein relatives Maß für die Menge des jeweils gebildeten Hydroxylierungsproduktes. Die senkrecht unter der gleichen Nummer stehenden Steroide stimmen nicht nur papierchromatographisch überein, sondern auch in ihren übrigen physikalischen Konstanten (sofern die Substanzen in Mengen gebildet wurden, die es erlaubten, sie rein zu isolieren). Es handelt sich also jeweils um die gleichen Hydroxylierungsprodukte.

Die Substanzen I, II, V, VI und VII konnten unter Anwendung der in Abschnitt B besprochenen Methoden rein isoliert und identifiziert werden. Die Substanzen III, IV, VIII und IX wurden nur in geringen

Tabelle 1. Prüfung der einzelnen *Curcularia*-Arten und -Stämme auf ihre Fähigkeit, Progesteron zu hydroxylieren. Schüttelkolbenkultur.
25 mg Progesteron je Kolben, Umsetzungszeit 24 Std
Anzahl der Kreuze gibt die relative Menge des Hydrolierungsproduktes an

Art bzw. Stamm	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX	
	11 β -		14 α -				(7 α , 11 β) ?		7 α , 14 α -		11 β , 14 α -		6 β , 14 α -					
<i>Curv. falcata</i> XXVI	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. lunata</i> XCIII	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. lunata</i> CIII	+		+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. lunata</i> XCV	+	+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. lunata</i> CII	+	+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. tetramera</i> CIX	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. pallescens</i> XCVI	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. pallescens</i> CI	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. geniculata</i> G	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. geniculata</i> XCI	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. geniculata</i> XCXXXIII	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. inaequalis</i> XCIV	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. oryzae</i> CXXXI	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. fallax</i> CXXXII	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Curv. uncinata</i> CXXXIV	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+		+	+

Mengen gebildet, so daß es nicht möglich war, sie präparativ rein darzustellen.

Substanz I: FP 185 bis 188°; (α)_D + 217° (Aceton); UV-Absorption max. 240–242 m μ ; Kristallform: Plättchen; papierchromatographisch mit authentischem 11 β -Hydroxyprogesteron identisch; Mischschmelzpunkt mit authentischem 11 β -Hydroxyprogesteron nicht erniedrigt; IR-Spektrum mit dem von 11 β -

Hydroxyprogesteron identisch. Mit Pyridin-Essigsäureanhydrit kein Acetat. Mit CrO₃-Eisessig Oxydationsprodukt; FP 168–171°.

Bei Substanz I handelt es sich demnach um 11 β -Hydroxyprogesteron.

Substanz II: FP 198 bis 200°; (α)_D + 190° (Chloroform); UV-Absorption max. 240 bis 242 m μ ; Kristallform: Nadeln; papierchromatographisch mit 14 α -Hydroxyprogesteron identisch; IR-Spektrum mit dem von 14 α -Hydroxyprogesteron identisch; bildet mit Essigsäureanhydrit kein Acetat und CrO₃-Eisessig kein Oxydationsprodukt.

Bei Substanz II handelt es sich demnach um 14 α -Hydroxyprogesteron.

Substanz V: Die Strukturaufklärung der Substanz V wurde bereits in einer anderen

Veröffentlichung beschrieben (SCHUBERT, HELLER, SIEBERT, ZETSCHKE u. LANGBEIN 1958). Es handelt sich um 7α , 14α -Dihydroxyprogesteron.

Substanz VI: FP $224-227^\circ$ (α)_D + 219° in Methanol. UV-Absorption max. $240-242\text{ m}\mu$; Kristallform, Dreiecke und Parallelogramme; mit Pyridin-Essigsäureanhydrid kein Acetat. Oxydation mit CrO_3 -Eisessig ergibt ein Oxydationsprodukt FP $222-226^\circ$. Das IR-Spektrum zeigt, daß ein Sechsringketon entstanden ist. Weiterhin ist eine nicht oxydierbare und damit tertiäre Hydroxylgruppe in der Substanz vorhanden. Die C,H-Analyse deutete auf ein Dihydroxyprogesteron. Die Strukturaufklärung wurde auf mikrobiologisch-enzymatischem Wege vorgenommen.

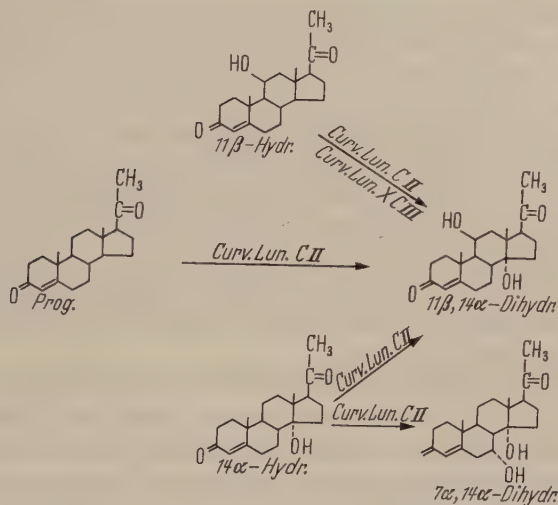


Abb.2. Schema zum Konstitutionsbeweis für das 11β , 14α -Dihydroxyprogesteron

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, sind die Pilze, die Substanz VI bilden, alle gute 11β -Hydroxylanten und außerdem auch zur 14α -Hydroxylierung fähig. Dies legte die Vermutung nahe, daß es sich bei Substanz VI um 11β - 14α -Dihydroxyprogesteron handeln könnte. Den Beweis dafür erbrachten wir dadurch, daß wir anstelle von Progesteron *Curv. lunata* CII 11β -Hydroxyprogesteron und 14α -Hydroxyprogesteron als Substrat anboten. Wir erhielten jedesmal Substanz VI (siehe Formel).

Auch bei der Umsetzung von 11β -Hydroxyprogesteron mit *Curv. lunata* XCIII, einem guten 14α -Hydroxylanten, erhielten wir Substanz VI. Damit ist die Stellung beider Hydroxylgruppen eindeutig festgelegt. Die chemischen Befunde (siehe oben) stehen mit diesem Befund in Einklang, so daß der Substanz VI die Struktur eines 11β -, 14α -Dihydroxyprogesterons zuzuschreiben ist. Diese Verbindung ist bisher nach unserem Wissen in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Substanz VII: Substanz VII konnte nur in kleinen Mengen rein isoliert werden. FP $246-249$. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wird Substanz VII hauptsächlich von den guten 14α -Hydroxylanten gebildet. Aus dieser Tatsache und dem Befund, daß man Substanz VII auch erhält, wenn man 14α -Hydroxyprogesteron mit *Curv. lunata* XCIII umsetzt, geht hervor, daß Substanz VII eine 14α -Hydroxylgruppe enthält. Da das IR-Spektrum von Substanz VII mit dem IR-Spektrum von 6β , 14α -Dihydroxyprogesteron übereinstimmt, handelt es sich bei Substanz VII um 6β , 14α -Dihydroxyprogesteron (SCHUBERT, HELLER u. a. 1960).

Substanz IV: die nicht isoliert werden konnte, da sie nur in kleinen Mengen gebildet wird, muß eine 11β -Hydroxylgruppe enthalten, da sie auch entsteht, wenn man 11β -Hydroxyprogesteron mit *Curv. lunata* CII umsetzt. Die Stellung der anderen OH-Gruppe konnte nicht einwandfrei ermittelt werden; es könnte sich dabei um eine 7α -Hydroxylgruppe handeln.

Aus Tab. 1 ist zu ersehen, daß alle *Curvularia*-Arten im wesentlichen die gleichen Hydroxylierungsprodukte bilden, d. h. sie sind alle mit den gleichen spezifischen Steroidhydroxylasen ausgestattet.

Zwischen den einzelnen Arten und auch innerhalb der Arten bestehen nur Unterschiede hinsichtlich der Menge der gebildeten Hydroxylierungsprodukte oder mit anderen Worten, Unterschiede in der Aktivität der Hydroxylasen. Dabei kann es sich um Unterschiede in der mengenmäßigen Ausstattung der einzelnen Pilzstämme mit den entsprechenden Steroidhydroxylasen handeln, oder um Unterschiede in dem Vorkommen von Aktivatoren bzw. Inhibitoren der einzelnen Hydroxylasen.

Die größte Gesamthydroxylaseaktivität zeigen die Vertreter der Art *Curv. lunata*. Etwa gleiche Aktivität weisen nur noch *Curv. falcata* und *Curv. pallescens* XCVI auf. Eine mittlere Gesamtaktivität besitzen *Curvularia tetramera* und *uncinata*. Die Hydroxylaseaktivität aller anderen Stämme ist nur gering.

Interessant ist vor allem das Verhalten der Art *Curv. lunata*. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß man die Vertreter dieser Art in zwei Gruppen einteilen kann. Die eine Gruppe bildet vorwiegend 14α -Hydroxyprogesteron und die sich daraus ableitenden Dihydroxyprogesterone, die andere überwiegend nur die in 11β -Stellung hydroxylierten Steroide, d. h. die eine Gruppe ist hauptsächlich nur mit einer 14α -Hydroxylase ausgestattet und enthält nur wenig 11β -Hydroxylase. Bei den anderen Vertretern der Art *Curv. lunata* liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt. Die Art *Curv. lunata* läßt sich demnach in zwei physiologische Rassen mit verschiedener Enzymaktivität bzw. -Ausstattung aufteilen. *Curv. falcata* nimmt zwischen beiden Rassen eine Mittelstellung ein, da diese Art annähernd gleiche 11β - und 14α -Hydroxylaseaktivität zeigt.

Das in 7α -Stellung hydroxylierte Monohydroxyprogesteron konnte ich aus keinem der Versuchsansätze isolieren oder papierchromatographisch nachweisen, obwohl, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, alle Stämme zu einer 7α -Hydroxylierung fähig sind. Dieser Befund läßt sich in zweierlei Weise deuten.

1. Die 7α -Hydroxylgruppe kann erst in das Steroidmolekül eingeführt werden, wenn in diesem bereits eine Hydroxylgruppe, besonders eine 14α -Hydroxylgruppe vorhanden ist.

2. Die Geschwindigkeit, mit der die 7α -Hydroxylierung durchgeführt wird, ist gegenüber derjenigen der 11β - und 14α -Hydroxylierungen

relativ gering, so daß sich das 7α -Monohydroxyprogesteron nicht anhäufen kann, da es sofort zu den Dihydroxyprogesteronen weiter verarbeitet wird. Die gleichen Überlegungen gelten für die 6β -Hydroxylierung.

III. Die Prüfung von Einsporkulturen auf die Steroidhydroxylaseaktivität

Die in dem Abschnitt II dargelegten Ergebnisse könnten auch dadurch zustande kommen, daß die von mir verwendeten Stämme genetisch nicht einheitlich sind, sondern aus einem Gemisch von Stämmen bestehen, von denen die einen zur 11β -, andere zur 14α - und wiederum andere zur 7α -Hydroxylierung fähig sind. Im Endeffekt würden in diesem Falle die gleichen Hydroxylierungsprodukte entstehen, wie ich sie nachweisen konnte. Um diese These zu überprüfen, legte ich von *Curv. lunata* CII Einsporkulturen an und testete sie auf ihr Verhalten gegenüber Progesteron. Bei der Prüfung von über 200 Kulturen dieser Art erhielt ich stets die gleichen Hydroxylierungsprodukte wie beim Ausgangsstamm. Das zeigte, daß die Fähigkeit zu den oben genannten Hydroxylierungen einem einheitlichen Stamm zukommt und genetisch fixiert ist.

Für alle weiteren Untersuchungen benutzte ich ausschließlich die Art *Curv. lunata* CII.

IV. Der zeitliche Verlauf der Steroidhydroxylierung

Der zeitliche Ablauf der Steroidhydroxylierungen wurde mit Schüttelkulturen, denen je Kolben 50 mg Progesteron zugesetzt worden waren, untersucht. Nach verschiedenen Zeiten wurden Kolben aufgearbeitet und die gebildeten Produkte quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 wiedergegeben.

Aus dem Kurvenverlauf ist zu entnehmen, daß das Progesteron sofort nach dem Zusatz ohne nennenswerte Induktionsperiode (lag period) angegriffen wird. Zunächst werden die Monohydroxyprogesterone gebildet und, solange noch genügend Progesteron vorhanden ist, trotz der ständigen Weiterhydroxylierung zu Dihydroxyprodukten angehäuft. Sobald aber alles Progesteron verbraucht ist, was nach spätestens 25–30 Std der Fall ist, nehmen die Monohydroxyprogesterone, da sie weiter oxydiert werden, ständig ab. Die Dihydroxyprogesterone erreichen mengenmäßig ihr Maximum nach spätestens 50 Std. Aber auch sie stellen noch nicht die Endoxydationsprodukte dar. Das mengenmäßige Abnehmen der Dihydroxyprogesterone bei längeren Inkubationszeiten und das Auftreten von sehr polaren Substanzen am Startpunkt der Chromatogramme zeigt, daß noch eine langsame Weiteroxydation der Dihydroxyprodukte stattfindet. Da diese Substanzen nur in sehr geringen Mengen gebildet wurden und zudem kaum vom Startpunkt

weg wanderten, konnten sie nicht näher charakterisiert oder quantitativ bestimmt werden. Es handelt sich wahrscheinlich um höher hydroxylierte Produkte.

Aus den Ergebnissen dieses Versuches lassen sich mehrere wichtige Schlußfolgerungen ziehen. Eindeutig geht daraus hervor, daß die Monohydroxyprogesterone und Dihydroxyprogesterone nicht gleichzeitig

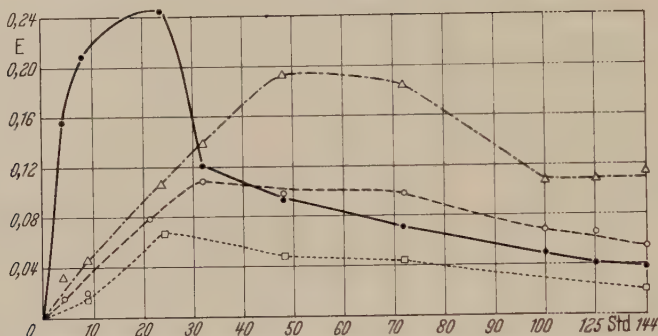


Abb. 3. Der zeitliche Verlauf der Steroidhydroxylierung mit *Curv. lunata* CII. Abszisse: Inkubationszeit in Stunden. Ordinate: Extinktion der Eluate (3 ml). ●—● 11β-Hydroxyprogesteron; ○—○ 7α, 14α-Dihydroxyprogesteron; △—△ 11β, 14α-Dihydroxyprogesteron. □-----□ Substanz IV

parallel zueinander, sondern nacheinander gebildet werden, d. h. die Hydroxylgruppen werden nacheinander in das Progesteronmolekül eingeführt. Die Mengen, die jeweils von den einzelnen Hydroxyprogesteronen gebildet werden, hängen daher (abgesehen von der Umsetzungszeit) im wesentlichen von der Geschwindigkeit ab, mit der die einzelnen Hydroxylierungen ausgeführt werden. Aus unseren Untersuchungen geht hervor (vgl. auch Abschnitt XIV), daß man dabei mehrere Faktoren berücksichtigen muß, die sich zum Teil überschneiden. Zunächst einmal werden die einzelnen Substrate verschieden schnell hydroxyliert. Generell kann man sagen, daß Progesteron am schnellsten angegriffen wird, weniger schnell die Monohydroxyprogesterone und am langsamsten die Dihydroxyprogesterone. Es ergibt sich also eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Anzahl der bereits im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen (bzw. der Polarität der Verbindung) und der Geschwindigkeit, mit der weitere OH-Gruppen eingeführt werden. Die Einführung von weiteren Hydroxylgruppen geht um so schneller vonstatten, je weniger Sauerstoff-Funktionen im Molekül bereits vorhanden sind.

Aber nicht nur die Zahl der bereits vorhandenen Hydroxylgruppen, sondern auch ihre Stellung im Molekül beeinflußt die weitere Hydroxylierung. Weiterhin haben die einzelnen Hydroxylasen verschiedene Aktivität.

Die in den Abschnitten II—IV mitgeteilten Ergebnisse lassen sich in folgendem Reaktionsschema zusammenfassen.

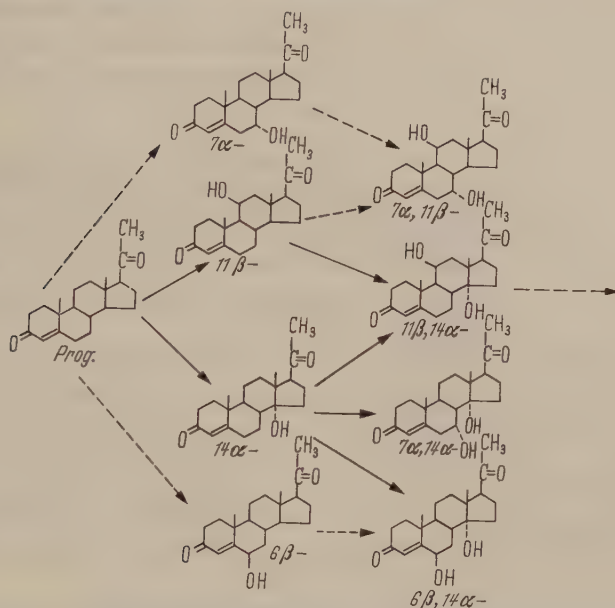


Abb. 4. Schema der von der Gattung *Curvularia* an Progesteron vorgenommenen Hydroxylierungen. Ausgezogene Pfeile: bewiesene Hydroxylierungen, unterbrochene Pfeile: mögliche Hydroxylierungsreaktionen

V. Der Einfluß des Nährbodens auf die Steroidhydroxylierung

1. Der Einfluß von Eisen, Magnesium und Phosphorsäure

Ich stellte in meinen Untersuchungen zunächst fest, welchen Einfluß verschiedene Komponenten unserer Grundnährlösung auf die Steroidhydroxylierung haben. Ich ging dabei so vor, daß ich die betreffenden Komponenten der Nährlösung nicht zusetzte. Dafür kamen natürlich nur die Nährbodenbestandteile in Frage, die nicht von vornherein in Makromengen für das Pilzwachstum notwendig sind, in unserem Falle also vor allem FeSO_4 , MgSO_4 und KH_2PO_4 . Die Ergebnisse sind in Tab. 2 wiedergegeben. Aus ihr ist zu entnehmen, daß die dem Nährboden in Form von Eisensulfat zugesetzten Eisenionen weder einen signifikanten Einfluß auf das Myceltrockengewicht noch auf die Hydroxylierungen haben; und zwar wohl deshalb, weil in den übrigen Nährbodenbestandteilen genügende Mengen an Eisen als Verunreinigungen enthalten sind, um den Bedarf des Pilzes weitgehend zu decken. Dagegen hat die Eliminierung des MgSO_4 aus dem Nährboden einerseits eine signifikante Erhöhung des Myceltrockengewichtes, andererseits eine Herabsetzung der Steroidhydroxylierung zur Folge.

Interessant ist auch der Phosphateinfluß. Durch die im Maisquellwasser zweifellos vorhandenen Phosphatverbindungen wird ein der Kontrolle äquivalentes Mycelwachstum erreicht. Die Steroidhydroxylierung dagegen ist empfindlicher gegen Phosphatmangel. Die Ergebnisse zeigen, daß auf dem Phosphatmangelnährboden die Steroidhydroxylierung in signifikanter Weise herabgesetzt ist.

Tabelle 2. Der Einfluß von Nährbodenbestandteilen auf die Steroidhydroxylierung. Schüttelkolbenkultur. Menge der Hydroxylierungsprodukte in Extinktion je 2.5 ml Eluat bezogen auf 1 g Myceltrockengewicht

Hydroxypr. = Hydroxyprogesteron, Dihydr. = Dihydroxyprogesteron

Nährboden	Mycel-trockengewicht in g/100 ml Nährlösung	11 β -Hydroxyprog.	7 α ,14 α -Dihydr.	11 β ,14 α -Dihydr.
Vollständiger Grundnährboden	0,821 \pm 0,027	0,546 \pm 0,009	0,185 \pm 0,002	0,188 \pm 0,007
Grundnährboden ohne FeSO ₄	0,792 \pm 0,033	0,576 \pm 0,009	0,201 \pm 0,009	0,197 \pm 0,001
Grundnährboden ohne MgSO ₄	1,113 \pm 0,036	0,382 \pm 0,004	0,090 \pm 0,004	0,136 \pm 0,005
Grundnährboden ohne Phosphat	1,071 \pm 0,016	0,344 \pm 0,008	0,052 \pm 0,009	0,122 \pm 0,008

Tabelle 3. Der Einfluß verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen auf die Progesteronhydroxylierung durch *Curvularia lunata* CII. Schüttelkolbenkultur. Inkubationszeit 24 Std. Menge der gebildeten Hydroxylierungsprodukte in Extinktion je 3 ml Eluat berechnet auf 1 g Myceltrockengewicht

Nährboden	End-pH	Mycel-trockengewicht g/100 ml Nährlösung	11 β -Hydroxyprogesteron	7 α , 14 α -Dihydroxyprogesteron	11 β , 14 α -Dihydroxyprogesteron
Grundnährboden	7,9	0,808 \pm 0,036	0,47 \pm 0,019	0,088 \pm 0,015	0,111 \pm 0,001
Grundnährboden m. Rohrzucker	7,2	1,164 \pm 0,026	0,56 \pm 0,022	0,106 \pm 0,010	0,145 \pm 0,009
Grundnährboden mit Stärke	7,0	0,572 \pm 0,061	1,16 \pm 0,15	0,148 \pm 0,007	0,29 \pm 0,017
Grundnährboden m. Ammonsulfat	2,8	0,903 \pm 0,058	0,92 \pm 0,027	0,225 \pm 0,0012	0,294 \pm 0,022
Grundnährboden mit Pepton	5,8	0,864 \pm 0,069	0,50 \pm 0,015	0,083 \pm 0,005	0,117 \pm 0,001

2. Der Einfluß verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen

Um den Einfluß verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Steroidoxydation zu untersuchen, ersetzte ich die Glucose im Grundnährboden nacheinander durch Rohrzucker und Stärke. In gleicher Weise verfuhr ich hinsichtlich der Stickstoffquelle und ersetzte das Natriumnitrat nacheinander durch Ammoniumsulfat und Pepton. Die Mengen wurden

so bemessen, daß jeder Nährboden äquivalente Mengen Stickstoff enthielt. Die erhaltenen Meßwerte wurden auf Umsatz je Gramm Mycel-trockengewicht umgerechnet. Die Ergebnisse (Tab.3) zeigen, daß bei Rohrzucker und vor allem Stärke als Kohlenstoffquellen die Steroidhydroxylierung erheblich gesteigert wird. Bei Stärke wird der Umsatz gegenüber Glucose mehr als verdoppelt. Diese Ergebnisse stimmen bemerkenswerterweise mit denen überein, die MANN, HANSON u. a. (1955) mit *Cunninghamella* erhielten.

Sehr interessant ist auch der Einfluß, den verschiedene Stickstoffquellen auf die Steroidhydroxylierung haben. Die Tabelle zeigt, daß bei Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Stickstoffquelle die Hydroxylierung stark gefördert wird und über doppelt so groß ist wie bei Verwendung

Tabelle 4. Der Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Steroidhydroxylierung von *Curvularia lunata* CII. Jeder Nährboden enthält äquivalente Mengen an Stickstoff und Phosphat. Schüttelkolbenkultur. Substrat Progesteron. Inkubationszeit 24 Std. Menge der gebildeten Hydroxyprogesterone in Extinktion der Eluate (3 ml) berechnet auf 1 g Myceltrockengewicht

Stickstoffquelle der Nährlösung	End-pH	Mycel- trockengewicht g/100 ml Nährlösung	11 β - Hydroxy- progesteron	7 α , 14 α - Dihydroxy- progesteron	11 β , 14 α - Dihydroxy- progesteron
NaNO_3	5,8	$0,652 \pm 0,003$	$0,293 \pm 0,005$	$0,112 \pm 0,03$	$0,114 \pm 0,03$
$(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$	2,5	$0,972 \pm 0,136$	$0,387 \pm 0,04$	$0,163 \pm 0,04$	$0,227 \pm 0,07$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	$0,856 \pm 0,052$	$0,34 \pm 0,017$	$0,26 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,03$
Harnstoff	5,3	$1,106 \pm 0,187$	$0,14 \pm 0,028$	$0,054 \pm 0,02$	$0,044 \pm 0,007$

von NaNO_3 . Pepton bewirkt dagegen keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle. Um die Ammoniumsulfatwirkung zu erklären, muß man zunächst zwei Fragen untersuchen: Handelt es sich dabei um eine spezifische Wirkung des Ammoniumions oder um einen pH-Effekt. Aus erklärlichen Gründen sinkt ja bei Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Stickstoffquelle das pH der Nährlösung mit der Verwertung des $(\text{NH}_4)^+$ durch den Pilz sehr stark ab. Die Tabelle zeigt, daß in der Grundnährlösung ein End-pH von 7,9 besteht, während im Ammoniumsulfatnährboden ein End-pH von 2,8 herrscht.

Bietet man dem Pilz Ammoniakstickstoff in Form von Harnstoff (Harnstoff wird bei Verwertung durch den Pilz in NH_3 , das in gepufferten Systemen sofort in NH_4^+ übergeht, und CO_2 zerlegt), so tritt im Laufe der Kulturdauer keine wesentliche Ansäuerung des Nährbodens ein. Tab.4 zeigt, daß in diesem Falle keine Förderung der Hydroxylierung gegenüber der Kontrolle eintritt, sondern eine Hemmung. Da man mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ im Prinzip die gleichen Förderungen erzielt, kann auch das Anion keinen wesentlichen Einfluß auf die Hydroxylierung haben. Ebenso hat das Nitration keine spezifische Hemmwirkung,

wie ein Vergleich mit den Werten des Peptonnährbodens beweist. Alle diese Feststellungen zeigen, daß sich die Ammoniumsulfatwirkung eindeutig auf einen p_H -Effekt zurückführen läßt. Ein niedriges p_H wirkt sich demnach günstig auf die Aktivität der Steroidhydroxylasen aus.

VI. Der Einfluß verschiedener p_H -Werte auf die Steroidhydroxylierung

Der im Abschnitt V aufgezeigte Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Steroidhydroxylierung kann dadurch zustandekommen, daß die beteiligten Steroidhydroxylasen ihr Aktivitätsoptimum bei so niedrigem p_H haben. Es kann sich aber auch um eine indirekte p_H -Wirkung handeln, d. h. das niedrige p_H beeinflusst primär Stoffwechselvorgänge, die ihrerseits die Steroidhydroxylierung beeinflussen. Um

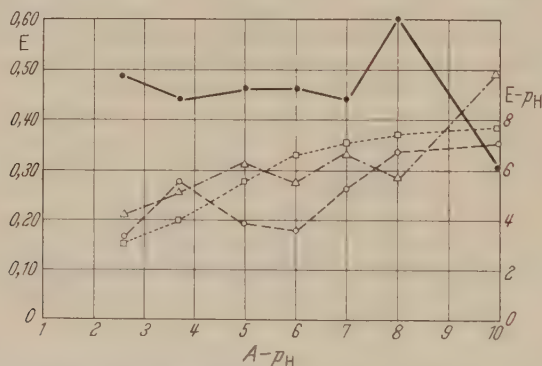


Abb. 5. Der Einfluß verschiedener p_H -Werte auf die Steroidhydroxylierung durch *Curv. lunata* CII. Abszisse: Anfangs p_H -Werte. Ordinate rechts: p_H nach 24stündiger Inkubation. Ordinate links: Extinktion der Eluate (3 ml). ●—● 11β-Hydroxyprogesteron; ○—○ 7α,14α-Dihydroxyprogesteron; △—△ 11β, 14α-Dihydroxyprogesteron; □—□ End- p_H

darüber mehr zu erfahren, untersuchte ich den Einfluß abgestufter p_H -Werte auf die Hydroxylierung.

Da es die Pufferkapazitäten der verschiedenen Puffer nicht gestatteten, die Nährlösung während der ganzen Kulturdauer des Pilzes auf abgestufte p_H -Werte einzustellen, wählte ich folgende Versuchsanordnung. Pilzmycel wurde in üblicher Weise auf dem Grundnährboden angezogen (p_H 7,8–7,9). Nach dreitägigem Wachstum wurde das Mycel von der Nährlösung abfiltriert, mit aqua dest. gewaschen und in Pufferlösungen mit abgestuften p_H -Werten resuspendiert. Ich verwendete dazu den Universalpuffer nach JOHNSON u. LINDSAY (RAUEN 1956). Auch bei dieser Methodik gibt der Puffer in den oberen und unteren Bereichen nach (siehe Abb. 5), man erhält indessen trotzdem eine abgestufte p_H -Skala.

Die Bestandteile des Puffers scheinen, wenn man andere vergleichbare Versuche heranzieht, keinen wesentlichen Einfluß auf die Steroidhydroxylierung zu haben. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Aus dem Verlauf der Kurven ist zu ersehen, daß die Hydroxylaseaktivität im allgemeinen zum alkalischen Bereich hin zunimmt. Im besonderen ist aber der p_H -Einfluß auf die Bildung der verschiedenen Hydroxylierungsprodukte etwas verschieden, was darauf hindeutet, daß die einzelnen Hydroxylasen unterschiedliche p_H -Optima haben.

Da mit lebendem, intaktem Mycel gearbeitet wurde, ist es schwierig, Aussagen darüber zu machen, ob diesen Kurven entsprechende p_H -Wirkungskurven der Hydroxylasen zugrunde liegen oder ob die Wasserstoffionenkonzentration primär Stoffwechseländerungen hervorruft, die ihrerseits sekundär die Geschwindigkeit der Hydroxylierungen modifizieren. Es ist anzunehmen, daß bei unseren Versuchen beide Vorgänge eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse dieses Versuches und die Ergebnisse, die bei den Nährbodenversuchen erhalten wurden, scheinen sich zu widersprechen. Dort hatten wir gefunden, daß die Steroidhydroxylierungen durch ein niedriges p_H gefördert wurden, während die bei den p_H -Versuchen erzielten Ergebnisse gerade eine entgegengesetzte Tendenz zeigen. Dieser Widerspruch löst sich aber auf, wenn man bedenkt, daß das niedrige p_H jeweils auf physiologisch verschiedenes Mycel einwirkte. Bei den Nährbodenversuchen beeinflusste das niedrige p_H Mycel, das sich in Wachstum und Entwicklung befand; bei dem p_H -Versuch wirkte es auf bereits fertiges, ruhendes Mycel ein. Die Wirkungsunterschiede, die sich dabei ergeben, lassen den Schluß zu, daß das niedrige p_H , wenn es während der Wachstums- und Entwicklungsphase auf den Pilz einwirkt, die Bildung eines Hemmfaktors verhindert oder die Bildung eines Faktors, der die Steroidhydroxylierung fördert, begünstigt. Diese Wirkung überlagert anscheinend diejenige, die das p_H normalerweise auf die Steroidhydroxylierung hat.

VII. Versuche mit abfiltriertem Mycel

In der Literatur finden sich widersprechende Angaben über den Ort der Steroidhydroxylierung. Der folgende Versuch sollte Aufklärung über diese Probleme bei dem von mir verwendeten Pilz bringen. Mycel wurde in der üblichen Weise in Schüttelkolben angezogen. Nachdem sich sehr reichlich Mycel entwickelt hatte, wurde es abfiltriert. Das Kulturfiltrat wurde unter sterilen Bedingungen in neue Schüttelkolben überführt und geprüft, ob es zur Steroidhydroxylierung fähig ist. Das abfiltrierte Mycel wurde dreimal mit aqua dest. gewaschen und in neue Schüttelkolben, die mit aqua dest. gefüllt waren, überführt. Zur Verarmung an Reservestoffen ließen wir das Mycel in diesen Kolben weitere 24 Std

schütteln, dann wurde es erneut abfiltriert, gewaschen und in den endgültigen Versuchslösungen resuspendiert. Als Kontrolle dienten Kolben, aus denen das Mycel nicht abfiltriert und dieser Prozedur unterworfen war. Es zeigte sich, daß das Kulturfiltrat bei meinem Pilz keine Fermente enthält, die eine Steroidhydroxylierung vornehmen können. Die steroidhydroxylierende Wirkung ist ausschließlich an das Mycel gebunden.

VIII. Der Einfluß von Enzymgiften auf die Steroidhydroxylierung

Über die Natur der bei der mikrobiellen Steroidhydroxylierung beteiligten Enzyme ist nur sehr wenig bekannt. Versuche mit Enzymgiften sind bisher auf diesem Gebiet kaum gemacht worden (MANN u. a. 1955). Wir untersuchten den Einfluß einiger Enzymgifte auf die Steroidhydroxylierung, deren Angriffspunkt gut bekannt ist.

Das Mycel wurde in üblicher Weise angezogen. Gleichzeitig mit dem Substrat wurden den einzelnen Kolben die entsprechenden Enzymgifte in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

1. Natriumcyanid

Abb. 6 zeigt, daß NaCN die Bildung der Dihydroprogesterone erst in relativ hohen Konzentrationen hemmt. Die Bildung der Monohydroprogesterone wird nur wenig beeinflusst. Bei 10^{-6} M/l tritt eine Förderung ein.

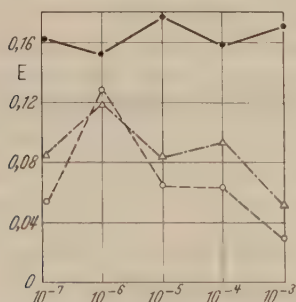


Abb. 6. Der Einfluß von NaCN auf die Steroidhydroxylierung. Abszisse: NaCN in Mol je Liter. Ordinate: Extinktion der Eluate. ●—● 11β-Hydroxyprogesteron; ○—○ 7α, 14α-Dihydroxyprogesteron; Δ—Δ 11β, 14α-Dihydroxyprogesteron

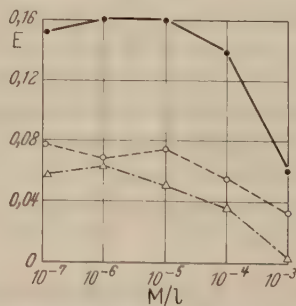


Abb. 7. Der Einfluß von NaN_3 auf die Steroidhydroxylierung. Abszisse: NaN_3 in Mol je Liter. Ordinate: Extinktion der Eluate (3 ml). ●—● 11β-Hydroxyprogesteron; ○—○ 7α, 14α-Dihydroxyprogesteron; Δ—Δ 11β, 14α-Dihydroxyprogesteron

2. Natriumazid

Gegen Natriumazid ist die Steroidhydroxylierung empfindlicher als gegen Cyanid (Abb. 7). 10^{-4} M/l NaN_3 wirkten bereits schwach hemmend. Bei einer Konzentration von 10^{-3} M/l werden die Steroidhydroxylasen zu über 50% gehemmt. Für das Natriumazid sind zwei Angriffspunkte

bekannt. Einmal greift es ähnlich wie 2,4 Dinitrophenol in die Atmungskettenphosphorylierungen ein und verhindert die Bildung energiereicher Phosphatbindungen, zum anderen blockiert es wie Cyanid Schwermetallenzyme.

3. 2,4-Dinitrophenol

Um den speziellen Angriffspunkt des Natriumazids in unseren Untersuchungen kennenzulernen, prüfte ich, welchen Einfluß 2,4-Dinitrophenol, welches auch die Synthese energiereicher Phosphatbindungen verhindert, auf die Steroidhydroxylierung hat. Aus Abb. 8 ist zu

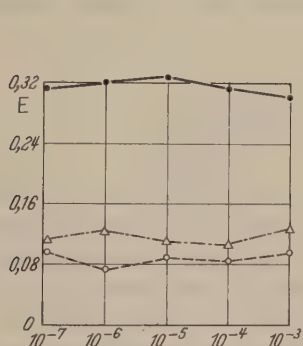


Abb. 8. Der Einfluß von 2,4-Dinitrophenol auf die Steroidhydroxylierung. Abszisse: 2,4 Dinitrophenol in Mol je Liter; Ordinate: Extinktion der Eluate (3 ml). ●—● 11β-Hydroxyprogesteron; ○—○ 7α, 14α-Dihydroxyprogesteron; △—△ 11β, 14α-Dihydroxyprogesteron

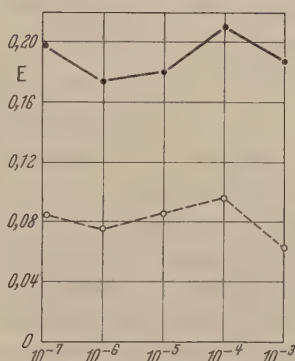


Abb. 9. Der Einfluß von NaF auf die Steroidhydroxylierung. Abszisse: NaF in Mol je Liter; Ordinate Extinktion der Eluate; ●—● 11β-Hydroxyprogesteron; ○—○ 7α, 14α-Dihydroxyprogesteron; △—△ 11β, 14α-Dihydroxyprogesteron

entnehmen, daß 2,4-Dinitrophenol auch in hohen Konzentrationen die Hydroxylierung der Steroide bei unserem Objekt nicht beeinflusst. Daraus geht hervor, daß die Hemmung der Steroidhydroxylierung durch Natriumazid nur durch die Blockierung eines Schwermetallenzym zustande gekommen sein kann.

4. Natriumfluorid

Natriumfluorid hemmt verschiedene Enzyme, die Mg^{++} als anorganisches Komplement benötigen. Das klassische Beispiel dafür ist die Hemmung der Enolase. In höheren Konzentrationen können auch Schwermetallenzyme blockiert werden. Abb. 9 zeigt, daß Natriumfluorid nur in hohen Konzentrationen eine schwache, nicht signifikante Hemmung der Steroidhydroxylierung bewirkt. Da normalerweise die Enolase bereits durch viel geringere Konzentrationen vollständig gehemmt wird, kommt auch hier wahrscheinlich die Hemmung durch eine Schwermetallblockierung zustande.

Die Ergebnisse der Hemmversuche lassen die Schlußfolgerung zu, daß bei der Steroidhydroxylierung ein Schwermetallenzym eine entscheidende Rolle spielt.

Zieht man in Betracht, daß zu der Steroidhydroxylierung ausschließlich molekularer Luftsauerstoff verwendet wird, so liegt der Schluß nahe, daß das Schwermetallenzym die Übertragung des Sauerstoffs auf das Steroid katalysiert. Als sauerstoffübertragende Schwermetallenzyme kommen — soweit bisher bekannt — in erster Linie Eisenenzyme vom Peroxydasetypus oder Kupferenzyme vom Phenoloxydasetypus in Frage. Um festzustellen, welcher von beiden Gruppen die Steroidhydroxylasen zuzuzählen sind, untersuchten wir den Einfluß, den die Spurenelemente Fe und Cu auf die Steroidhydroxylierung ausüben.

IX. Der Einfluß von Spurenelementen auf die Steroidhydroxylierung

1. Der Einfluß von Fe^{++} -Ionen

Um den Einfluß von Fe^{++} auf die Steroidhydroxylierung zu untersuchen, war es zunächst notwendig, den verwendeten Nährboden soweit als möglich eisenfrei zu machen, da die verwendeten Reagentien wie aus den Versuchen im Abschnitt V hervorgeht, als Verunreinigung bereits soviel Fe^{++} enthalten, daß dadurch der Bedarf des Pilzes vollauf gedeckt ist. Dazu wurden die Nährlösungen vor dem Sterilisieren nach der Methode von OHLSON u. JOHNSON (1949) gereinigt. Den auf diese Weise an Eisenionen weitgehend verarmten Nährböden, wurden dann definierte Mengen an Eisensulfat zugesetzt. Um irgendwelche pH-Effekte von vornherein auszuschließen, stellte ich Versuche sowohl mit der Grundnährlösung als auch mit dem Ammoniumsulfatnährboden an. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 festgehalten.

Betrachten wir zunächst die Progesteronkurve bei Verwendung des Ammoniumsulfatnährbodens, so ist zu sehen, daß das Progesteron mit steigenden Mengen zugesetzten Fe^{++} rasch abnimmt, d. h. hydroxyliert wird. In den Kolben ohne Fe^{++} -Zusatz wird das Progesteron praktisch nicht angegriffen. Dementsprechend finden wir in diesen Kolben auch nur einen geringen Umsatz zu 11β -Hydroxyprogesteron. Die Bildung der Monohydroxyprogesterone nimmt mit steigenden Eisenmengen rapide zu und erreicht mit 5γ $Fe^{++}/100$ ml Nährlösung sein Maximum. Bei 5γ Fe^{++} wird sechsmal soviel Mono-Hydroxyprogesteron gebildet als bei 0γ Fe^{++} . Dabei ist natürlich auch zu beachten, daß die Kurve der monohydroxylierten Produkte aus der Geschwindigkeit der Bildung und Weiterhydroxylierung resultiert. Das Maximum der Dihydroxyprogesteronbildung wird mit etwa 20γ $Fe^{++}/100$ ml Nährlösung erreicht, während bei 0γ Fe^{++} praktisch keine Dihydroxyprogesterone gebildet werden. Daraus geht hervor, daß mit $20-50 \gamma$ Fe^{++} (+ den in der Nähr-

lösung nach der Reinigung noch vorhandenen Resteisen)/100 ml Nährlösung die maximal mögliche Menge an Steroidhydroxylasen synthetisiert wird. Daß diese Wirkungen nicht etwa durch bloße Wachstumsunterschiede hervorgerufen wurden geht daraus hervor, daß die Trockengewichtskurve mit der Steroidhydroxylierung nicht parallel läuft. Während das Wachstumsmaximum (ausgedrückt in Trockengewicht) bereits

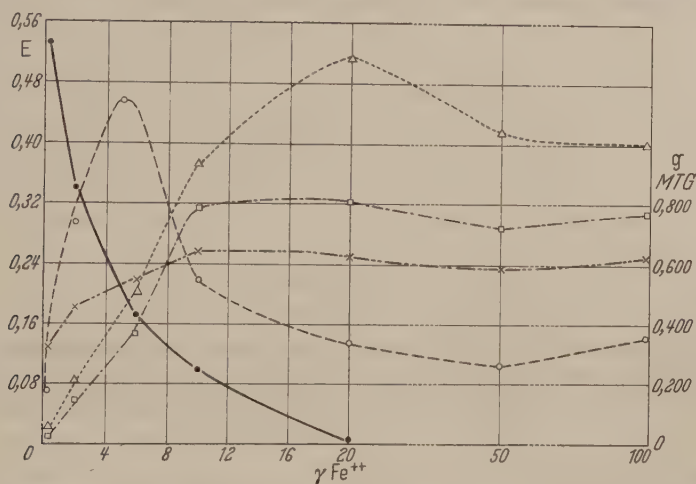


Abb. 10. Der Einfluß von Fe^{++} auf die Steroidhydroxylierung. *Curv. lunata* CII auf Ammoniumsulfatnährboden angezogen. Progesteron als Substrat. Abszisse: Fe^{++} je 100 ml Nährlösung. Ordinate: rechts: Myceltrockengewicht in Gramm; Ordinate links: Extinktion der Eluate; ●—● Progesteron; ○—○ 11 β -Hydroxyprogesteron; □—□ 7 α , 14 α -Dihydroxyprogesteron; Δ—Δ 11 β , 14 α -Dihydroxyprogesteron; ×—× Myceltrockengewicht

bei 10 $\gamma \text{ Fe}^{++}$ /100 ml Nährlösung erreicht wird, liegt das Maximum für die Steroidhydroxylierung erst bei etwa 20 $\gamma \text{ Fe}^{++}$. Außerdem nimmt das Trockengewicht von 0 $\gamma \text{ Fe}^{++}$ bis 10 $\gamma \text{ Fe}^{++}$ nur etwa um das Doppelte zu, während die Steroidhydroxylierung zur gleichen Zeit von praktisch Null auf ein Vielfaches ansteigt. Die Tatsache, daß auch in den Kolben ohne Eisenzusatz bereits Mycelwachstum erfolgt, erklärt sich leicht daraus, daß es naturgemäß kaum möglich ist, aus einem Nährboden, der auch natürliche Ingredienzien enthält (Maisquellwasser), alles Eisen restlos zu entfernen. Diese geringen in der Nährlösung noch vorhandenen Eisenmengen erlauben bereits ein begrenztes Mycelwachstum, doch reichen sie anscheinend nicht aus, um die Synthese einer äquivalenten Menge von Steroidhydroxylasen zu gestatten.

Mit Czapek-Dox-Nährlösung + Maisquellwasser erhielt ich im Prinzip die gleichen Ergebnisse, nur daß hier die Maxima der Monohydroxy- und Dihydroxyprogesteronbildung zu größeren Eisenmengen verschoben sind.

2. Der Einfluß von Cu^{++} -Ionen auf die Steroidhydroxylierung

Nach der gleichen Methode wie bei den Fe^{++} -Versuchen, wurde der Einfluß von Cu^{++} -Ionen auf die Steroidhydroxylierung untersucht. Der Ammoniumsulfatnährboden wurde wiederum zunächst nach der Methode von OLSON u. JOHNSON soweit als möglich von Kupferionen befreit. Dann wurden definierte Mengen Cu^{++} in Form von $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 wiedergegeben.

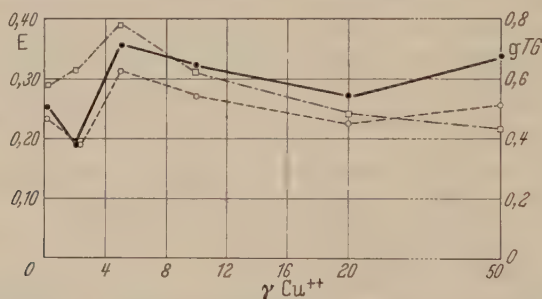


Abb. 11. Der Einfluß von Cu^{++} auf die Steroidhydroxylierung. *Curr. lunata* CII wurde auf Ammoniumsulfat-Nährboden angezogen. Abszisse: Cu^{++} je 100 ml Nährlösung. Ordinate rechts: Myceltrockengewicht in Gramm. Ordinate links: Extinktion der Eluate berechnet auf 0,750 g Myceltrockengewicht; ○---○ $7\alpha, 14\alpha$ -Dihydroxyprogesteron; ●—● $11\beta, 14\alpha$ -Dihydroxyprogesteron; □---□ Myceltrockengewicht

Aus den Kurven ist zu entnehmen, daß bereits in den Kolben, denen kein CuSO_4 zugesetzt wurde, relativ große Mengen Progesteron in Dihydroxyprogesterone umgewandelt wurden. Bei $5 \gamma \text{ Cu}^{++}/100 \text{ ml}$ Nährlösung zeigt die Umwandlung ein schwaches Maximum, das sich indessen statistisch nicht sichern läßt. Der eventuelle Einwand, daß ich mich mit den Kupferangaben + den in der Nährlösung noch vorhandenen Resten bereits außerhalb des ansteigenden Kurvenverlaufs befunden habe, wird durch den Verlauf der Trockengewichtskurve widerlegt, die von $0-5 \gamma \text{ Cu}^{++}$ noch kräftig ansteigt und erst bei höheren Gaben wieder abfällt.

Vergleicht man den Einfluß, den Fe^{++} und Cu^{++} -Ionen auf die Steroidhydroxylierung haben, so ergibt sich, daß bei den Eisenversuchen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen zugeführter Eisenmenge und Aktivität der Steroidhydroxylasen besteht. Aus den Ergebnissen des Kupferversuches läßt sich, wenn überhaupt, höchstens ein indirekter Einfluß der Cu^{++} -Ionen auf die Steroidhydroxylierung ablesen. Ich ziehe daraus den Schluß, daß bei der Steroidhydroxylierung ein Eisenenzym eine entscheidende Rolle spielt.

X. Der Einfluß von Vitaminen auf die Steroidhydroxylierung

Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß bei den Steroidhydroxylierungen in der Nebennierenrinde Zusatz von Nicotinsäureamid (RYAN

u. ENGEL 1956) die Hydroxylierungen fördert. Da die Nicotinsäureamidförderung durch DPNH oder TPNH ersetzt werden kann, wirkt es dadurch, daß es die Synthese der Co-Dehydrogenasen fördert. Uns interessierte daher, ob bei der mikrobiellen Steroidhydroxylierung gleiche oder ähnliche Cofaktoren wirksam sind.

Da sich *Curv. lunata* CII nicht ohne Maisquellwasser als Wachstoffsquelle anziehen läßt (siehe Abschnitt CI), war es nicht möglich, Vitaminmangelnährböden herzustellen und damit den Einfluß von einzelnen zugesetzten Vitaminen auf die Steroidhydroxylierung zu untersuchen. Ich benutzte daher für unsere Versuche eine Methode, wie sie auch von NAGIB (1958) erfolgreich angewendet wurde. Ich zog in der üblichen Weise Mycel in Schüttelkolben auf der Grundnährlösung an. Nachdem sich reichlich Mycel entwickelt hatte, wurde es abfiltriert, dreimal mit aqua dest. gewaschen und in Schüttelkolben, die mit aqua dest. gefüllt waren, suspendiert. Zur Verarmung an Reservestoffen ließ ich das Mycel darin weitere 48 Std schütteln. Danach wurde es erneut abfiltriert, gewaschen und in neuer Czapek-Dox-Nährlösung — aber ohne Maisquellwasser — resuspendiert. Dieser Nährlösung hatten wir zuvor die in der Tabelle aufgeführten Vitamine einzeln in einer Menge von 100 γ /100 ml Nährlösung zugesetzt (Sterilisation um eine Zerstörung der Vitamine weitgehend zu vermeiden 10 min bei 110° C, siehe RAUEN 1956).

Tabelle 5. Der Einfluß von Vitaminen auf die Steroidhydroxylierung durch *Curv. lunata* CII. Schüttelkolbenkultur. Progesteron als Substrat. Inkubationszeit 24 Std. Menge der gebildeten Hydroxyprogesterone in Extinktion der Eluate (3 ml) bezogen auf 1 g Myceltrockengewicht

Vitamine 100 γ /100 ml Nährlösung	End- pH	Myceltrocken- gewicht	11 β - Hydroxy- progesteron	7 α , 14 α - Dihydroxy- progesteron	11 β , 14 α - Dihydroxy- progesteron
Kontrolle ohne Vitamine	3,4	1,179 \pm 0,193	0,148 \pm 0,0005	0,081 \pm 0,003	0,128 \pm 0,014
B ₁	3,1	0,929 \pm 0,163	0,244 \pm 0,027	0,129 \pm 0,008	0,206 \pm 0,014
B ₂	3,3	0,767 \pm 0,032	0,328 \pm 0,005	0,172 \pm 0,0004	0,200 \pm 0,008
B ₆	2,9	0,908 \pm 0,152	0,183 \pm 0,010	0,235 \pm 0,025	0,156 \pm 0,017
Panthenol	3,3	0,943 \pm 0,144	0,205 \pm 0,022	0,137 \pm 0,087	0,186 \pm 0,015
Nicotinsäureamid	3,1	1,057 \pm 0,042	0,165 \pm 0,010	0,093 \pm 0,005	0,143 \pm 0,010

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Aus diesen geht hervor, daß Nicotinsäureamid unter meinen Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die Steroidhydroxylierung hat. Ebenso ergibt Panthenol keine signifikante Erhöhung der Steroidhydroxylierung.

Dagegen erweist sich Vitamin B₂ (Riboflavin, Lactoflavin) in dieser Hinsicht als stark wirksam. Durch Zusatz von Riboflavin zur Nährlösung wird die Steroidhydroxylierung um mehr als das Doppelte erhöht. Da Vitamin B₂ Bestandteil der wasserstoffübertragenden Flavinenzyme

ist, scheinen diese eine wichtige Rolle bei der mikrobiellen Steroidhydroxylierung zu spielen.

Vitamin B₁ und B₆ zeigen gegenüber der Kontrolle eine geringere, aber gesicherte Förderung der Steroidhydroxylierung.

XI. Der Einfluß von Säuren des Citronensäurecyclus auf die Steroidhydroxylierung

Die Hydroxylierung von Steroiden durch Nebennierenhomogenate wird durch verschiedene Säuren des Citronensäurecyclus gefördert. Besonders wirksam sind dabei Fumarsäure und Äpfelsäure, weniger wirksam Citronensäure, Isocitronensäure, Aconitsäure und α -Ketoglutarinsäure (HAYANO u. DORFMAN 1954, SWEAT u. LIPSCOMB 1955, SWEAT 1951). Uns interessierte, ob diese Säuren auch bei der mikrobiellen Steroidhydroxylierung eine Rolle spielen. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei dem vorangehenden Vitaminversuch, nur daß ich hier das „Hungermycel“ nicht in neuer Czapek-Dox-Nährlösung, sondern in den 0,01 m Lösungen der in der Tabelle angegebenen Säuren suspendierte. Diese Konzentration ist die gleiche, wie sie von den oben genannten Autoren bei Versuchen mit Nebennierenrindenhomogenaten verwendet wurde. Wir stellten diese Säurelösungen mit Natronlauge auf pH 5,0 ein. Die Ergebnisse (Tab.6) zeigen, daß Fumarsäure die von unserem Pilz durchgeführten Steroidhydroxylierungen nicht fördert,

Tabelle 6. Der Einfluß verschiedener Säuren auf die Steroidhydroxylierung von *Curv. lunata* CII. Mycel wurde in den 0,01 m Säurelösungen suspendiert. Substrat Progesteron. Inkubationszeit 24 Std. Menge der gebildeten Hydroxyprogesterone in Extinktion der Eluate (3 ml)

Säure	11 β -Hydroxyprogesteron	7 α , 14 α -Dihydroxyprogesteron	11 β , 14 α -Dihydroxyprogesteron
Kontrolle = aqua dest.	0,184 \pm 0,013	0,132 \pm 0,005	0,196 \pm 0,003
Fumarsäure	0,142 \pm 0,013	0,120 \pm 0,006	0,179 \pm 0,011
Bernsteinsäure	0,253 \pm 0,043	0,218 \pm 0,013	0,168 \pm 0,005
Citronensäure	0,253 \pm 0,015	0,120 \pm 0,009	0,160 \pm 0,015
Äpfelsäure	0,210 \pm 0,042	0,216 \pm 0,010	0,284 \pm 0,020

sondern schwach hemmt. Ebenso wirkt Citronensäure eher hemmend als fördernd auf die Hydroxylierungen. Anders verhalten sich dagegen Bernsteinsäure und vor allem Äpfelsäure. Beide Säuren fördern die Hydroxylierungen signifikant.

Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei den mikrobiellen Steroidhydroxylierungen Transhydrogenierungen eine große Rolle spielen, denn es ist sicher kein Zufall, daß gerade die beiden Säuren, die direkt dehydriert werden können, die Hydroxylierungen fördern, während Fumarsäure, die ein Wasserstoffacceptor ist, hemmend wirkt.

Ascorbinsäure hat in den Konzentrationen von 1–100 mg/100 ml Nährlösung keinen signifikanten Einfluß auf die Steroidhydroxylierung.

XII. Der Einfluß von Wasserstoffperoxyd auf die Steroidhydroxylierung

Aus der Mitwirkung von Flavinenzymen und Eisenenzymen könnte man folgern, daß ein peroxydatischer Mechanismus die Steroidhydroxylierung bewirkt. Ich prüfte daher den Einfluß, den H_2O_2 auf die Hydroxylierung hat.

Fügt man H_2O_2 in Konzentrationen von 1% und 0,4% Schüttelkulturen zu, so wird die Steroidhydroxylierung gehemmt.

Mycel, das abfiltriert und in Lösungen von 0,1; 0,05; 0,01 und 0,005% H_2O_2 suspendiert und unter anaeroben Verhältnissen bebrütet wurde, zeigte keine Hydroxylaseaktivität.

XIII. Werden die Steroidhydroxylasen von *Curv. lunata* CII adaptiv gebildet?

Ich wählte folgende Versuchsanordnung, um diese Frage bei unserem Objekt zu klären. Ein Teil der Kulturen wurde auf Grundnährboden angezogen, dem vor dem Beimpfen unter sterilen Bedingungen 5 mg Progesteron/100 ml Nährlösung zugesetzt worden waren. Der andere Teil der Kulturen wurde ohne Progesteronzusatz angezogen. Nach dreitägigem Wachstum hatte sich auf beiden Nährböden reichlich Mycel entwickelt, und es wurde allen Kolben 25 mg Progesteron zugesetzt. Aus Kontrollkolben, die nur den ersten Zusatz von 5 mg Progesteron erhalten hatten, konnte ich ersehen, daß zu dieser Zeit die zuerst zugesetzten 5 mg Progesteron praktisch vollständig in die Dihydroxyprodukte umgewandelt worden waren. Die Werte für die Monohydroxyprogesterone entsprechen daher vollständig der Neubildung.

Abb. 12 zeigt, daß die Hydroxylierung des Progesterons sofort nach dem Zusatz ohne Induktionsperiode (lag period) bei beiden Kulturen anläuft. Da auch der weitere Verlauf der Hydroxylierung bei beiden Kulturen vollkommen parallel geht, kann keine adaptive Fermentbildung vorliegen, da in diesem Falle die Kulturen, die auf Progesteron angezogen worden waren, zumindest am Anfang, das Progesteron schneller hydroxylieren müßten als die Kulturen, die ohne Progesteron angezogen wurden.

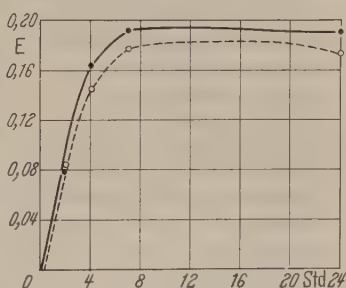


Abb. 12. Die Hydroxylaseaktivität von *Curvularia*-Mycel, das auf einem Nährboden mit Progesteronzusatz angezogen wurde. Abszisse: Inkubationszeit in Stunden. Ordinate: Extinktion der Eluate. ●—● 11β-Hydroprogesteronbildung von normal angezogenem Mycel; ○—○ 11β-Hydroxyprogesteronbildung von Mycel, das auf einem Nährboden mit Progesteronzusatz angezogen wurde

XIV. Die Substratspezifität der Steroidhydroxylasen

Bisher ist nur wenig über die Substratspezifität der Steroidhydroxylasen bekannt. In der Literatur findet man, daß bei den meisten Untersuchungen Steroide mit der $\Delta 4,3$ -Keto-Gruppierung als Substrate verwendet wurden. Einzelne Autoren berichten jedoch auch über

Tabelle 7

Die Substratspezifität der Steroidhydroxylasen von *Curv. lunata* CII. Anzahl der Kreuze = relatives Maß für die Menge der gebildeten Hydroxylierungsprodukte

Substrat	Hydroxylierungs- produkte
Progesteron	+++++
9 α -Hydroxyprogesteron	++++
11 α -Hydroxyprogesteron	+++
11 β -Hydroxyprogesteron	+ + + +
14 α -Hydroxyprogesteron	+ + + +
21-Hydroxyprogesteron	
(Desoxycorticosteron, Cortexon)	+++
Desoxycorticosteronacetat	— —
7 α , 14 α -Dihydroxyprogesteron	+
11 β , 14 α -Dihydroxyprogesteron	+
12 β , 15 α -Dihydroxyprogesteron	—
17 α , 21-Dihydroxyprogesteron	
(Reichsteins Substanz S)	+++
Reichsteins Substanz S	
21-Monoacetat	— —
15 α , 21-Dihydroxyprogesteron	+
Hydrocortison	
$\Delta 4$ -Pregnentriol (11 β , 17 α , 21)- dion (3, 20)	+
Cortison	
$\Delta 4$ -Pregnendiol (17 α , 21)-trion (3, 11, 20)	+
Cortisonacetat (21-Monoacetat)	— —
$\Delta 5$ -Pregnenol (3 β)-on-(20)	
(Pregnenolon)	++
Allopregnandion (3, 20)	++
Pregnanol (11 α)-dion-(3, 20)	+
Pregnandiol(3 α , 6 α)-on-(20)	++
Cholesterin	— —
Ergosterin	— —
Testosteron	++
Methyltestosteron	++

langsamer die Dihydroxyprogesterone. Die Steroide, die fünf Sauerstoff-Funktionen im Molekül haben, wie z. B. Cortison und Hydrocortison, werden am langsamsten angegriffen. Es ergibt sich damit eine deutliche Abhängigkeit der Hydroxylierungsgeschwindigkeit von der Anzahl der im Steroidmolekül vorhandenen Sauerstoff-Funktionen oder in anderen

die Hydroxylierung von Steroiden, die diese Konfiguration nicht besitzen (siehe die Zusammenfassungen S. 237 und SCHUBERT u. SIEBERT 1958). Ich prüfte durch Einsatz verschiedener Steroide, wie die Verhältnisse bei meinem Versuchsobjekt liegen. Die in Tab. 7 angeführten Substrate wurden Schüttelkulturen zugesetzt (10 bis 20 mg/100 ml Nährlösung). Die Umsetzungszeit betrug 24 Std.

Die in Tab. 7 zusammengefaßten Ergebnisse lassen mehrere Schlußfolgerungen zu. Deutlich ist zu erkennen, daß die $\Delta 4,3$ -Keto-Steroide um so schlechter angegriffen werden, je mehr sie bereits Sauerstoff-Funktionen im Molekül enthalten. Progesteron wird am schnellsten hydroxyliert, weniger schnell die Monohydroxyprogesterone und noch

Worten, eine Abhängigkeit von der Polarität oder Hydro- bzw. Lipophilie der entsprechenden Verbindung.

Innerhalb der Monohydroxy- und Dihydroxyprogesterone erfolgt anscheinend eine weitere Differenzierung durch die Stellung der Hydroxylgruppen, so wird z. B. 11β -Hydroxyprogesteron besser angegriffen, als 11α -Hydroxyprogesteron und 17α , 21 -Dihydroxyprogesteron schneller als 11β , 14α -Dihydroxyprogesteron. 12β , 15α -Dihydroxyprogesteron wird überhaupt nicht angegriffen. Auch hier scheint eine Abhängigkeit zwischen der Polarität der Verbindung und ihrer Hydroxylierung zu bestehen, da z. B. die 11α -Hydroxylgruppe den Steroiden einen polareren Charakter verleiht als die 11β -Hydroxylgruppe. Auch das 12β , 15α -Dihydroxyprogesteron ist eine relativ polare Substanz, da beide Hydroxylgruppen — bildlich gesprochen — sperrig vom Molekül abstehen. Eine Deutung dieser Ergebnisse ist in zweierlei Richtung möglich.

1. Die Enzym-Substrat-Affinität ist um so größer, je weniger Hydroxylgruppen im Pregnengrundgerüst vorhanden sind bzw. je lipophiler das Molekül ist.

2. Da nach unserer Meinung die Steroidhydroxylierung endocellulär erfolgt (zumindest bei unserem Objekt), besteht auch die Möglichkeit, daß die polareren Steroide schlechter durch die Zellwand in die Zelle permeieren und dadurch eine langsamere Hydroxylierung dieser Verbindungen zustande kommt.

Die Hydroxylierung von Allopregnan $3,20$ -dion, Pregnanol (11α)-dion- $(3,20)$ und Pregnandiol ($3\alpha,6\alpha$)-on- (20) zeigt, daß die $\Delta 4,3$ -Keto-Gruppierung keine notwendige Voraussetzung dafür ist, daß die Verbindungen von den Steroidhydroxylasen angegriffen werden. Auch $\Delta 5$ -Steroide (Pregnenolon) werden von den Hydroxylasen angegriffen. Ebenso spielt die Verknüpfung der Ringe A und B in trans- oder cis-Stellung (allo- und normal-Verbindungen) keine entscheidende Rolle. Allerdings werden alle diese Verbindungen langsamer angegriffen als die entsprechenden $\Delta 4,3$ -Keto-Steroide. Testosteron und Methyltestosteron werden auch hydroxyliert, folglich kann der Seitenkette am Kohlenstoffatom 17 in dieser Hinsicht keine besondere Bedeutung zukommen. Dagegen werden die Sterine, die eine längere Seitenkette haben, wie z. B. das Ergosterin und das Cholesterin von den Steroidhydroxylasen unseres Pilzes nicht angegriffen. Dieser Befund stimmt mit dem anderer Autoren überein (MINNINGER u. a. 1956). Der Grund dafür ist zweifellos in der langen Lipophilen Seitenkette der Sterine zu suchen, sei es, daß diese sterisch die Enzymsubstratbindung oder den Eintritt der Verbindung in die Zelle verhindert. Interessant ist die Tatsache, daß die Acetate verschiedener Verbindungen nicht hydroxyliert werden. Setzt man diese Acetate als Substrate ein, so erhält man niemals die entsprechenden hydroxylierten Acetate, sondern neben dem freien Alkohol die

Hydroxylierungsprodukte dieser freien Verbindung. Diese Beobachtung ist auch von verschiedenen anderen Autoren gemacht worden (EPPSTEIN, MEISTER u. a. 1956). Die Pilze enthalten demnach Esterasen, die den Acetatrest verseifen und den freien Alkohol liefern.

D. Diskussion der Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der Stammprüfung geht hervor, daß die von uns geprüften Vertreter der Pilzgattung *Curvularia* Steroide in 6 β , 7 α , 11 β und 14 α -Stellung hydroxylieren können. Daraus ergibt sich die Frage, ob die einzelnen Hydroxylierungen von verschiedenen reaktions-spezifischen Steroidhydroxylasen, d. h. 6 β -, 11 β -, 7 α -, und 14 α -Hydroxylasen vorgenommen werden oder von einer einzigen weniger spezifisch wirkenden. Der unterschiedliche Einfluß, den vor allem das p_H (Abschnitt VI), aber auch Phosphatmangel (Abschnitt V), Pyridoxin (Abschnitt X) und Bernsteinsäure (Abschnitt XI) auf die einzelnen Hydroxylierungen haben, weist darauf hin, daß mehrere reaktionsspezifische Steroidhydroxylasen vorhanden sind. Eine endgültige Klärung dieser Frage kann aber erst dann stattfinden, wenn die Isolierung der wirksamen Fermente gelungen ist. Da alle geprüften Arten und Stämme im wesentlichen die gleichen Hydroxylierungen durchführen, ist die ganze Gattung *Curvularia* sehr einheitlich mit diesen spezifischen Steroidhydroxylasen ausgestattet. Eine ähnliche uniforme Ausstattung mit spezifischen Steroidhydroxylasen weisen — wie aus der Literatur zu ersehen ist — die Pilzgattung *Rhizopus*, *Penicillium* *Aspergillus* (DULANEY u. a. 1955) und andere auf.

Die Frage, ob es sich bei diesen Steroidhydroxylasen um konstitutive Enzyme handelt oder ob diese erst nach Kontakt mit dem Substrat von dem Pilz adaptiv gebildet werden, konnte ich für mein Objekt eindeutig zugunsten der konstitutiven Enzyymbildung entscheiden. Die gleiche Auffassung wird von PETERSON u. ZAFFERONI (bei FRIED 1955) vertreten. Die von DULANEY u. a. (1955) aufgestellte Behauptung, daß die Steroidhydroxylasen von *Aspergillus ochraceus* adaptiv gebildet werden, ist von den Autoren nicht eindeutig bewiesen, sondern lediglich aus indirekten Befunden gefolgert worden.

Ich bin der Meinung, daß die höheren Pilze in der Regel konstitutiv mit Steroidhydroxylasen ausgestattet sind. Das schließt nicht aus, daß in Ausnahmefällen auch adaptive Enzyymbildung erfolgen kann.

Anders scheinen dagegen die Verhältnisse bei den Actinomyceten zu liegen. Hier hat PERLMAN (1957) sehr eindeutig bewiesen, daß die Steroidhydroxylasen adaptiv gebildet werden.

Die konstitutive Ausrüstung der höheren Pilze mit Steroidhydroxylasen wirft naturgemäß die Frage auf, welche Bedeutung diese Enzyme für den Pilz haben bzw. welche Funktion sie im Stoffwechsel des Pilzes

ausüben. Dabei muß man vor allem zwei Möglichkeiten in Betracht ziehen. 1. Die Steroidhydroxylasen spielen beim Steroidstoffwechsel der Pilze eine Rolle. 2. Es handelt sich bei diesen Hydroxylierungen um relativ substratunspezifische Entgiftungsvorgänge, ähnlich wie sie auch im Säugetierorganismus in der Leber durchgeführt werden.

Sterine gehören bei den Pilzen wie bei allen anderen höheren Organismen zur Grundausrüstung der Zelle. Es wäre daher möglich, daß die Steroidhydroxylasen am Stoffwechsel dieser Verbindungen beteiligt sind. Diese Möglichkeit ist indessen sehr unwahrscheinlich. Setzt man Ergosterin, das am weitesten verbreitete Pilzsterin, Kulturen von *Curv. lunata* CII zu, so wird dieses Sterin von den Hydroxylasen nicht angegriffen. Der Grund dafür könnte aber auch darin zu suchen sein, daß Ergosterin nicht in die Pilzzelle permeieren kann und daß innerhalb der Zelle synthetisiertes Ergosterin durchaus von den Steroidhydroxylasen angegriffen wird. In diesem Falle müßte es aber möglich sein, hydroxylierte Sterine bzw. Sterinabbauprodukte nachzuweisen. In der Literatur ist über eine solche Beobachtung bisher noch nicht berichtet worden. Erst kürzlich haben VISCHER u. WETTSTEIN (1958) die Sterine eines *Rhizopus nigricans*-Stammes, der hohe Steroidhydroxylaseaktivität zeigte, untersucht. Sie konnten im Sterinanteil keine hydroxylierten Produkte feststellen.

Da die meisten Pilze die Steroide nur hydroxylieren, aber nicht weiter abbauen, kann der Ausnutzung als Kohlenstoffquelle ebenfalls keine Bedeutung zukommen.

Am wahrscheinlichsten ist die Theorie, daß es sich bei den Steroidhydroxylasen um relativ substratunspezifische Enzyme handelt, die durch Hydroxylierung lipophile Substrate wasserlöslicher machen und auf diese Weise entgiften. Für diese Hypothese lassen sich mehrere experimentelle Tatsachen ins Feld führen. Durch die Arbeiten von CAPEC (1957) und LESTER u. a. (1958) ist nachgewiesen worden, daß Progesteron und Desoxycorticosteron in entsprechenden Konzentrationen die Sporenkeimung, das Wachstum und den Stoffwechsel von *Neurospora crassa* und *Rhizopus nigricans* hemmen. Die von den genannten Pilzen gebildeten hydroxylierten Steroide (bei *Rhizopus nigricans* 11 α -Hydroxyprogesteron) haben dagegen keine oder nur geringe Hemmwirkung.

Es besteht die Möglichkeit, daß die stark lipophilen und auch oberflächenaktiven Steroide, wie z. B. Progesteron, aktive Zellzentren blockieren und auf diese Weise die Hemmungen hervorrufen. Durch die Hydroxylierungen werden diese Verbindungen wasserlöslicher und auf diese Weise entgiftet. Es ist anzunehmen, daß die Pilze an ihren natürlichen Standorten und unter natürlichen Bedingungen häufiger mit derartigen oder ähnlichen lipophilen Substanzen in Berührung

kommen und daß daher dieser Hydroxylierungs-Entgiftungsmechanismus für den Pilz von großem Nutzen sein kann.

Über den Mechanismus der mikrobiellen Steroidhydroxylierung und die daran beteiligten Enzyme ist so wenig bekannt, weil es noch nicht gelungen ist, zellfreie Enzymextrakte der Steroidhydroxylasen aus den Mikroorganismen herzustellen. Durch Anwendung von markiertem Sauerstoff (O_2^{18} und H_2O^{18}) konnten HAYANO (1956), BLOOM u. a. (1956) sowie SWEAT u. a. (1956) zeigen, daß bei der mikrobiellen Steroidhydroxylierung molekularer Luftsauerstoff verwendet wird. Sauerstoff aus H_2O^{18} wird nicht in die Steroide eingebaut. Diese Ergebnisse schließen aus, daß die Hydroxylierung über eine Dehydrierung mit nachfolgender Wasseranlagerung erfolgt. Diese Schlußfolgerung wird durch andere Versuche bestätigt (FRIED u. Mitarb. 1955).

Die Hemmung der mikrobiellen Steroidhydroxylierung durch NaCN und NaN_3 sowie NaF weist darauf hin, daß bei der Steroidhydroxylierung Schwermetallenzyme beteiligt sind. Auffallend ist dabei die Tatsache, daß NaCN erst in relativ hohen Konzentrationen eine Hemmung hervorruft und bei 10^{-6} M/l sogar eine Förderung bewirkt. Auch die Steroidhydroxylierungen, die in der Nebennierenrinde stattfinden, werden durch Inhibitoren, die Metallenzyme blockieren, wie Diäthylthiocarbamat und ÄDTA gehemmt (SWEAT 1951; SWEAT 1956; GRANT 1956). Dagegen sollen Cyanid und Azid diese Hydroxylierungen nur wenig oder nicht beeinflussen (RYAN u. ENGEL 1956; GRANT u. BROWNIE 1956; RYAN u. ENGEL 1957).

Zieht man die Ergebnisse von HAYANO, daß nur molekularer Luftsauerstoff bei der Hydroxylierung verwendet wird, und die Ergebnisse meiner Hemmversuche in Betracht, so liegt der Gedanke nahe, daß das Schwermetallenzym die Aktivierung bzw. die Übertragung des Luftsauerstoffs auf das Steroid bewirkt. Für solche Reaktionen kommen vor allem Kupferenzyme und Eisenenzyme in Frage. Auf Grund meiner Spurenelementversuche läßt sich eindeutig aussagen, daß bei den mikrobiellen Steroidhydroxylierungen Eisenenzyme beteiligt sind, wahrscheinlich sind es die hydroxylierenden Fermente selbst. Ob die Steroidhydroxylasen der Säugetiere auch Eisenfermente sind, ist meines Wissens bisher noch nicht bekannt.

Weitere wichtige Anhaltspunkte für den Mechanismus der mikrobiellen Steroidhydroxylierung ergeben sich aus den Vitamin- und Säureversuchen. Aus der Literatur ist bekannt, daß Nicotinsäureamid, Mg^{++} , DPN, TPN, ATP und Fumarat bzw. andere Intermediärprodukte des Citronensäurecyclus für die 11β -Hydroxylierung von Steroiden durch Nebennierenrindenhomogenate notwendig sind bzw. diese fördern (BROWNIE u. GRANT 1954, 1956; GRANT 1956; GRANT u. BROWNIE 1956; HAYANO u. DORFMANN 1953, 1954). Durch die Arbeiten von GRANT

(1956), SWEAT u. LIPSCOMB (1955) wurde indessen geklärt, daß nur molekularer Sauerstoff und TPNH essentielle Kofaktoren sind. Die anderen oben angeführten Faktoren sind nur für die Bildung von TPN und seine Erhaltung im reduzierten Zustand notwendig. Das gleiche Kofaktorenbedürfnis wurde für die 21-Hydroxylierung durch Mikrosomenpräparate aus der Nebennierenrinde ermittelt.

Bei der mikrobiellen Hydroxylierung liegen die Verhältnisse etwas anders. Auch hier haben Mg^{++} und Phosphationen wie aus den Versuchen in Abschnitt V hervorgeht, einen Einfluß auf die Steroidhydroxylierung. Dagegen hatte von außen zugeführtes Nicotinsäureamid bei meinem Objekt und unter meinen Versuchsbedingungen keine signifikante Wirkung auf die Hydroxylierung.

Bei meinem Objekt wird die Steroidhydroxylierung sehr stark durch Riboflavin gefördert. Riboflavin ist ein Bestandteil der wasserstoffübertragenden Flavinenzyme. Da, wie ich bereits oben feststellte, diese Steroidhydroxylierung nicht über eine Dehydrierung mit nachfolgender Wasseranlagerung erfolgt und aus Analogie zur Mitwirkung von TPNH bei der Steroidhydroxylierung durch Nebennierenrindenhomogenate, nehme ich an, daß bei der mikrobiellen Hydroxylierung reduzierte Flavinenzyme beteiligt sind. Diese Auffassung wird durch die Versuche mit den Säuren des Citronensäurecyclus unterstützt. Bernsteinsäure und Äpfelsäure, die im Verlauf des Cyclus unmittelbar dehydriert werden, fördern die Steroidhydroxylierung, während der Fumarsäure, die als Wasserstoffacceptor wirkt, eine schwach hemmende Wirkung zukommt.

Mg^{++} , PO_4^{---} , Vitamin B_1 und B_6 sind wahrscheinlich indirekt bei der Synthese bzw. der Reduktion der Flavinenzyme beteiligt. Trotz Unterschieden in Einzelheiten stimmen daher die Steroidhydroxylierungen, die in der Nebennierenrinde der Säugetiere und in den Mikroorganismen durchgeführt werden, in prinzipiellen Punkten weitgehend überein. Übereinstimmung herrscht vor allem in folgenden Hauptpunkten:

1. Zur Hydroxylierung ist molekularer Sauerstoff notwendig.
2. Bei der Hydroxylierung spielt ein Schwermetallenzym eine entscheidende Rolle.
3. Ein reduziertes Agens (TPNH, reduziertes Flavinenzym) ist zum Ablauf der Reaktion notwendig.
4. Mg^{++} Ionen, Phosphat und verschiedene Säuren des Citronensäurecyclus fördern die Hydroxylierung.

In der Literatur sind eine ganze Anzahl von Hydroxylierungen beschrieben, bei denen wie bei der Steroidhydroxylierung O_2 , ein Schwermetallenzym und ein reduzierendes Agens (meist TPNH) beteiligt sind (MITOMA u. UDENFRIED 1955; MITOMA, POSSNER u. a., BRODIE, AXELRODE u. a. 1955; COOPER u. BRODIE 1957; MITOMA 1956). Der Mechanismus dieser Reaktionen und die Natur der daran beteiligten

Enzyme konnte bisher in keinem Fall einwandfrei aufgeklärt werden. Auf jeden Fall scheinen Oxydationen, die nach einem ähnlichen Mechanismus wie bei der Steroidhydroxylierung durchgeführt werden, sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich relativ weit verbreitet zu sein.

Die Tatsache, daß bei uns ein reduziertes Flavinenzym und molekularer Sauerstoff beteiligt sind, lenkte unsere Aufmerksamkeit zunächst auf einen peroxydatischen Mechanismus. Ein großer Teil der Flavinenzyme kann Wasserstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxyd direkt auf Sauerstoff übertragen. Aber auch aus DPNH und TPNH kann durch Oxydation H_2O_2 entwickelt werden (DOLIN 1955; BRODIE u. a. 1955; COOPER u. BRODIE 1957). Das Wasserstoffperoxyd könnte durch eine Peroxydase zur Hydroxylierung der Steroide verwendet werden.

Die Annahme eines peroxydatischen Mechanismus wird durch die Befunde von BLOOM u. SHULL (1955) unterstützt. Diese beiden Autoren erhielten, wenn sie *Curvularia lunata* auf Δ^9 11 17α -Desoxycorticosteron einwirken ließen, das entsprechende 9, 11 Epoxyd. Gegen diesen Mechanismus lassen sich aber auch eine ganze Reihe ernsthafter Bedenken erheben. So ist es mir und anderen Autoren nicht gelungen, die Hydroxylierung durch direkt zugeführtes oder enzymatisch entwickeltes H_2O_2 zu stimulieren (GRANT 1956; GRANT u. BROWNIE 1956).

Verschiedene Autoren fanden (RYAN u. ENGEL 1956), daß die durch Nebennierenrindenhomogenate bewirkte Steroidhydroxylierung durch Katalase nicht gehemmt wird. Auch die geringe Empfindlichkeit des Eisenenzym gegen NaCN spricht gegen die Mitwirkung eines Häminfermentes, die normalerweise bereits durch geringe CN^- -Konzentrationen gehemmt werden. Da indessen die Versuche mit intaktem Mycel bzw. organisierten Enzympräparaten gemacht wurden, kann es auch sein, daß das H_2O_2 , die Katalase und das Cyanid nicht an die aktiven Zentren gelangt sind.

Von einer Reihe von Autoren (UDENFRIED u. a. 1954, 1955 und MASON u. a. 1956) ist die Bildung aktiver Hydroxylgruppen an Hand von Modellhydroxylasen studiert worden (Ascorbinsäure- Fe^{++} -Äthylen-diamintetraacetat und O_2 , sowie Fenton-Reagens). Möglicherweise spielen ähnliche Systeme bei der Steroidhydroxylierung eine Rolle (TALALAY 1957).

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die geprüften 15 verschiedenen Arten und Stämme der Pilzgattung *Curvularia* können alle Progesteron in 6β -, 7α -, 11β -, 14α -Stellung hydroxylieren. Demnach ist die Gattung *Curvularia* sehr einheitlich mit diesen Hydroxylasen ausgestattet. Zwischen den einzelnen Arten und auch innerhalb der Arten bestehen nur Unterschiede hinsichtlich der Aktivität der einzelnen Hydroxylasen.

2. Die Hydroxylgruppen werden nacheinander in das Steroidmolekül eingeführt.

3. Die Zusammensetzung des Nährbodens beeinflusst die Steroidhydroxylierung. Anzucht des Pilzes auf einem stark sauren Nährboden fördert die Hydroxylierung.

4. Ein niedriges p_H fördert die Steroidhydroxylierung aber nur, wenn es während der Entwicklungsphase auf das Pilzmycel einwirkt. Die Hydroxylaseaktivitäten von ruhendem Mycel werden im allgemeinen durch niedrige p_H -Werte herabgesetzt, durch höhere gefördert. Die einzelnen Hydroxylasen reagieren etwas unterschiedlich.

5. *Curv. lunata* gibt keine Steroidhydroxylasen an die Kulturlösung ab.

6. Die Steroidhydroxylierung wird durch NaN_3 und $NaCN$ gehemmt. 2,4 Dinitrophenol und NaF haben praktisch keinen Einfluß auf die Steroidhydroxylierung.

7. Fe^{++} -Ionen sind für die Steroidhydroxylierung notwendig. Cu^{++} -Ionen haben keinen signifikanten Einfluß auf die Steroidhydroxylaseaktivität.

8. Die Steroidhydroxylierung wird durch Zusatz von Riboflavin stark gefördert. Vitamin B_6 und B_1 sind etwas weniger wirksam. Nicotinsäureamid und Panthanol sind wirkungslos.

9. Die Steroidhydroxylierung wird durch Bernsteinsäure und Äpfelsäure gefördert, während Fumarsäure und Citronensäure schwach hemmend wirken.

10. Die Steroidhydroxylasen von *Curv. lunata* werden nicht adaptiv gebildet.

11. Die Substratspezifität der Steroidhydroxylasen wurde untersucht. Von den C_{21} -Steroiden werden nicht nur die $\Delta 4,3$ -Keto-Steroide, sondern auch $\Delta 5$ -Steroide und die gesättigten Steroide der normal und allo-Reihe angegriffen. Auch die C_{19} -Steroide werden gut hydroxyliert. Die Steroide werden in der Regel um so besser angegriffen, je weniger sie bereits Sauerstofffunktionen im Molekül besitzen.

Auch die Stellung der bereits im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen hat einen Einfluß. Steroide mit einer längeren, lipophilen Seitenkette, wie z. B. Sterine, werden nicht hydroxyliert.

12. Die 21-Acetate verschiedener Steroide werden von den Hydroxylasen nicht angegriffen. Die *Curvularia*-Arten enthalten aber Esterasen, die den Acetatrest abspalten und den freien Alkohol liefern.

Meinem verehrten Lehrer Prof. H. v. GUTTENBERG, Herrn Dr. A. SCHUBERT und Herrn Dipl.-Chemiker R. SIEBERT danke ich vielmals für das rege Interesse und die Unterstützung, die sie meiner Arbeit zuteil werden ließen. Zu großem Dank bin ich auch meiner Frau und Herrn Dr. K. HELLER verpflichtet. Meine Frau unterstützte mich bei der Isolierung der Einsporkulturen. Herr Dr. K. HELLER übernahm freundlicherweise die Aufnahme und Interpretation der IR-Spektren.

Literatur

- AGNELLO, E. J., B. L. BLOOM and G. B. LAUBACH: J. Amer. chem. Soc. **77**, 4684 (1955).
- BLOOM, M. B., and G. M. SHULL: J. Amer. chem. Soc. **77**, 5767 (1955).
- BLOOM, B. M., M. HAYANO, A. SAITO, D. STONE and R. J. DORFMANN: Fed. Proc. **15**, 222 (1956).
- BOEDIJN, K. B.: Bulletin du Jardin Botanique Buitenzorg III **13**, 120 (1933).
- BOURGAÏN, L.: Dissertation; zit. nach VISCHER u. WETTSTEIN. Angew. Chem. **69**, 456 (1957).
- BRODIE, B. B.: Science **121**, 603 (1955).
- CAPEK, A. O., O. HANC u. E. MALICOVA: Československie Mikrobiologie **2**, C. 5, 282 (1957).
- COOPER, J. R., and B. BRODIE: J. Pharmacol. exp. Ther. **120**, 75 (1957).
- DIRSCHERL, W., W. KORUS u. H. SCHRIEFERS: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **305**, 116 (1956).
- DOLIN, M. J.: Arch. Biochem. **55**, 415 (1955).
- DULANEY, L. E., E. O. STAPLEY and CH. HLAVAC: Mycologia (N. Y.) **47**, 464 (1955).
- DULANEY, L. E., W. J. MCALEER, M. KOSLOWSKI, K. O. STAPLEY and J. JAGLOM: Appl. Microbiol. **3**, 372 (1955).
- EPPSTEIN, S. H., P. D. MEISTER, M. C. MURRAY and D. H. PETERSON: Vitam. and Horm. **14**, 359 (1956).
- FINCH, C. A.: Mfg. Chemist **25**, 247 (1954).
- FLOREY, K.: Chimia **8**, 81 (1954).
- FRIED, J., R. W. THOMA, D. PERLMAN, J. E. HERZ and A. BORMAN: Recent Progr. Hormone Res. **11**, 149 (1955).
- GRANT, J. K.: Biochem. J. **64**, 559 (1956).
- GRANT, J. K., and A. C. BROWNIE: Biochim. biophys. Acta **18**, 433 (1956).
- HAINES, W. J., and N. A. DRAKE: Fed. Proc. **9**, 180 (1950).
- HAINES, W. J., and J. N. KARNEMAAT: Meth. biochem. Anal. **1**, 171 (1954).
- HANC, G., u. E. RIEDL-TUMOVA: Pharmazie **9**, 877 (1954).
- HAYANO, M., and J. R. DORFMAN: J. biol. Chem. **211**, 227 (1954).
- HAYANO, M., R. SABS, R. J. DORFMAN and O. HECHTER: Recent Progr. Hormone Res. **12**, 79 (1956).
- HAYANO, M., A. SAITO, B. STONE and R. J. DORFMAN: Biochim. biophys. Acta **21**, 380 (1956).
- HAYANO, M., M. GUT, R. J. DORFMAN, O. K. SEBEK and D. H. PETERSON: J. Amer. chem. Soc. **80**, 2336 (1958).
- HOPPE-SEYLER u. THIERFELDER: Handbuch der Physiologisch. u. patholog. chem. Analyse. 3. Band, S. 1617. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.
- KAROW, E. O., and D. N. PETSIVAS: Ind. Eng. Chem. **48**, 2213 (1956).
- KRAMLI, A., and J. HORVATH: Nature (Lond.) **162**, 619 (1948); **163**, 219 (1949).
- LESTER, G., D. STONE and O. HECHTER: Arch. Biochem. **75**, 196 (1958).
- LORY, C. L., H. M. MILL, J. M. WEINSTOCK and L. M. HENDERSON: J. biol. Chem. **211**, 405 (1954).
- MANN, K. M., F. H. HANSON, P. M. O'CONNELL, H. V. ANDERSON, M. P. BRUNNER and J. N. KARNEMAAT: Appl. Microbiol. **3**, 14 (1955).
- MANN, K. M., F. R. HANSON and P. W. O'CONNELL: Fed. Proc. **14**, 251 (1955).
- MASON, H. B., W. L. FOWLKS and E. PETERSON: J. Amer. chem. Soc. **77**, 2914 (1955).
- MASON, H. S., and J. ONOPRIENKO: Fed. Proc. **15**, 310 (1956).
- MEYSTRE, CH., M. VISCHER u. A. WETTSTEIN: Helv. chim. Acta **38**, 381 (1955).
- MININGER, R. F., and M. E. WALL: Arch. Biochem. **60**, 427 (1956).

- MITOMA, CH.: Arch. Biochem. **60**, 476 (1956).
- MITOMA, CH., and S. UDENFRIED: J. Pharmacol. exp. Ther. **113**, 40 (1955).
- MITOMA, CH., H. S. POSSNER, H. C. REITZ and S. UDENFRIED: Arch. Biochem. **61**, 431 (1956).
- NAGNIB, K.: Experientia (Basel) **14**, 61 (1958).
- NEHER, R.: Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen. Elsier Publ. Comp.
- O'CONNELL, P. W., K. M. MANN, K. D. NIELSON and F. R. HANSON: Appl. Microbiol. **3**, 16 (1955).
- OLSON, B. H., and M. J. JOHNSON: J. Bact. **57**, 235 (1949).
- PERLMAN, D., M. J. WEINSTEIN and G. E. PETERSON: Canad. J. Microbiol. **3**, 6, 841 (1957).
- PETERSON, D. H.: Research **6**, 309 (1953).
- PETERSON, D. H.: In: Perspectives and Horizons in Microbiology. New Brunswick: Rutgers 1955.
- PETERSON, D. H.: Rec. Chem. Progr. **7** (1956).
- PETERSON, D. H., and M. C. MURRAY: J. Amer. chem. Soc. **47**, 1871 (1952).
- RAUEN, H. E.: Biochem. Taschenbuch. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1956.
- RYAN, K. J., and L. L. ENGEL: J. Amer. chem. Soc. **78**, 2654 (1956).
- RYAN, K. J., and L. L. ENGEL: J. biol. Chem. **225**, 103 (1957).
- RUBIN, B. A., C. CASAS CAMPILLO, J. HENDRICH, F. CORDOLA and A. ZAFFARONI: Bact. Proc. **56**, 33 (1956).
- SCHUBERT, A., u. R. SIEBERT: Chem. Ber. **91**, 1856 (1958).
- SCHUBERT, A., K. HELLER, R. SIEBERT, K. ZETSCHKE u. G. LANGBEIN: Naturwissenschaften **45**, 264 (1958).
- SCHUBERT, A., K. HELLER, D. ONKEN, K. ZETSCHKE u. B. KLÜGER: Z. Naturforsch. **15b**, 269 (1960).
- SHULL, G. M., and D. A. KITA: J. Amer. chem. Soc. **77**, 763 (1955).
- SHULL, G. M., D. A. KITA and J. W. DAVISSON: US Patent **2**, 702, 812 (1955).
- SWEAT, M. L.: J. Amer. chem. Soc. **73**, 4056 (1951).
- SWEAT, M. L., R. A. ALDRICH, C. H. DE BRUIN, W. L. FOWLKS, L. R. HEISELT and H. S. MASON: Fed. Proc. **15**, 367 (1956).
- TALALAY, P.: Physiol. Rev. **37**, 362 (1957).
- UDENFRIED, S., S. C. CLARK, J. AXELRODE and B. DE BRODIE: J. biol. Chem. **208**, 731 (1954).
- VELICK, S. F.: Ann. Rev. Biochem. **25**, 277 (1956).
- VISCHER, W., u. A. WETTSTEIN: Angew. Chem. **69**, 456 (1957).
- VISCHER, E., and A. WETTSTEIN: Advanc. Enzymol. **20**, 237 (1958).
- WETTSTEIN, A.: Experientia (Basel) **9**, 465 (1955).
- ZAFFARONI, A., E. B. BURTON and M. H. KEUTMANN: Science **111**, 6 (1950).
- ZANDER, J., u. M. SIMMER: Klin. Wschr. **32**, 23, 24, 529 (1954).

Department of Botany and Plant Pathology, Michigan State University, U.S.A.,
and Institut de Botanique générale, Université de Genève, Suisse

A Role for Glycine in Light stimulated Nucleic Acid Synthesis by *Blastocladiella emersonii*

By

EDWARD C. CANTINO and GILBERT TURIAN

With 3 Figures in the text

(Received September 19, 1960)

The "ordinary colorless" (O.C.) plants of the aquatic fungus, *Blastocladiella emersonii*, grow more rapidly in blue light than in the dark and, simultaneously, their generation time is lengthened; the phenomenon is dependent upon the presence of CO₂ or bicarbonate (CANTINO and HORENSTEIN 1956, 1957, 1959). Furthermore, this increase in growth is associated with a light-induced shift in the organic/inorganic phosphorus pool in the organism (CANTINO 1959), an increase in the ratio of deoxyribose-nucleic acid (DNA) to total nucleic acids, and an increased rate of nuclear reproduction (TURIAN and CANTINO 1959). With non-growing plants, light induces both increased uptake of glucose and increased uptake of CO₂; when the latter is labeled with C₁₄ and the pool of 80% alcohol-soluble, labeled compounds derived therefrom is examined, the most pronounced, detectable effect of illumination is an increase in the amount of labeled succinate and a decrease in the amount of labeled ketoglutarate in the organism (CANTINO and HORENSTEIN 1956). This and other evidence, some direct and other indirect (TURIAN and CANTINO 1959; McCURDY and CANTINO 1960), led us to conclude that light speeds up, in some fashion, the following sequence of events:

1. Ketoglutarate + CO₂ + TPNH $\xrightarrow{\text{isocitric dehydrogenase}}$
isocitrate + TPN.
2. Isocitrate $\xrightarrow{\text{isocitritase}}$ succinate + glyoxylate.
3. Glyoxylate + alanine $\xrightarrow{\text{glycine-alanine transaminase}}$
glycine + pyruvate.
4. Glycine $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ (x) $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ (y) $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ (etc.)
 $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ (thymine, thymidine) $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ DNA.

The purpose of this report is to provide additional, in vivo evidence which bears upon this scheme. The hypotheses which were tested are best

understood by referring to Fig.1, where we have emphasized the two, developmental focal points in the life history of the organism which were examined in the present study:

(Stage A). During the early (e.g., one to seven-nucleate-) stages in development of a young O. C. germling following spore germination, light induces a microscopically-demonstrable increase in nuclear multiplication

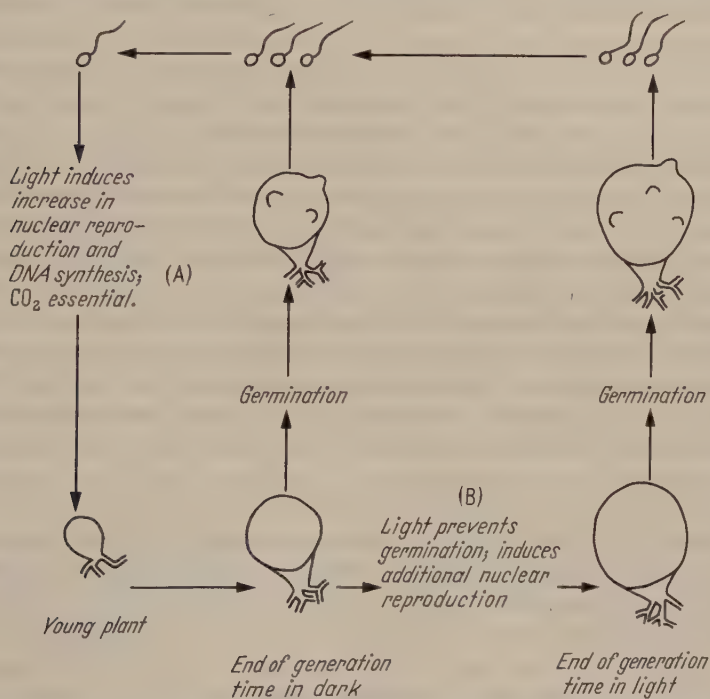


Fig.1. Schematic digest of the life history of *Blastocladia emersonii* emphasizing two of the light-sensitive stages (A and B) during the ontogeny of "ordinary colorless" plants that were investigated in this report

and a chemically-detectable increase in DNA synthesis (TURIAN and CANTINO 1959). During this first phase of the organism's generation time, a crucial enzyme, isocitritase, is present in the spore; however, it is quickly diluted out following germination because synthesis of isocitritase does not occur during this stage in development (MCCURDY and CANTINO 1960) unless high concentrations of bicarbonate (CANTINO 1961) are provided.

(Stage B.) Toward the end of the generation time of a dark grown plant, illumination has a two-fold effect. It prevents germination on its normal

(dark) time schedule; i.e., it interferes with cleavage of the multinucleate protoplast into thousands of uninucleate spores and their subsequent liberation. Instead, the plant is induced to carry out additional nuclear divisions. Thus, illumination leads to a larger plant with a greater complement of nuclei (and therefore, theoretically, more DNA) and, ultimately, compartmentalization of the terminal cell of the plant into a proportionately greater number of uninucleate spores (CANTINO and HORENSTEIN 1957). Also, during the second half of the generation time of the plant which precedes the final, spore-cleavage stage, synthesis of isocitritase begins and continues until the final, specific activity (i.e., per unit of protein) of this enzyme in the mature plant is about the same as that found in the spores (MCCURDY and CANTINO 1960).

Our experiments were based on the following considerations: Relative to Stage A, we argued: if the proposed metabolic scheme is correct, then during development of germlings and young plants of *Blastocladiella* in the light, radiant energy somehow manages to (a), speed up a supply route for glycine synthesis which is independent of isocitritase activity (see MCCURDY and CANTINO 1960, for discussion), or (b) push or pull the CO₂-dependent sequence of reactions through the increasingly rate limiting enzyme, isocitritase, which is not being synthesized at this time. If so, it follows that the transient, internal glycine pool involved in nucleic acid synthesis must be higher, and/or its rate of turnover greater, in illuminated plants than in those incubated in the dark. This, in turn, suggests that if such germlings are bathed in glycine and subjected to illumination, they should have less "need" for an external supply of glycine than their dark-incubated counterparts and, therefore, should absorb less glycine from the external environment; but on the other hand, if a CO₂-free atmosphere is maintained simultaneously, the light-induced chain of reactions [in (b), above] should no longer occur by virtue of its requirement for CO₂. Under these conditions, therefore, any detectable, light-induced depression of glycine uptake should be abolished; i.e., glycine utilization should increase and revert to its normal dark level.

Relative to Stage B, we argued: if our proposed scheme is correct, a nearly-mature, dark-grown plant which is soon destined to cease (or has ceased) nuclear multiplication should no longer absorb appreciable quantities of glycine from its external environment if it is kept in the dark. On the other hand, if such a plant is illuminated, whereupon its machinery for nuclear synthesis is accelerated (or initiated) once again, it should simultaneously commence to absorb some glycine from its environment — at least, more than it had absorbed in the dark.

Relative to the overall, developmental picture, we argued: since isocitritase appears to be a "bottleneck enzyme" (in this area of metabolism; cf. CANTINO 1961; MCCURDY and CANTINO 1960; LOVETT and CANTINO

1961) involved in glycine synthesis, and since manufacture of this enzyme does not begin until ca. half the generation time of the organism has been completed, it follows that if preformed non-growing plants of various ages are incubated in glycine in the dark, (a), the rate of glycine uptake should gradually increase during the early stages of development when the total isocitritase per plant is being depleted quickly by dilution; however, (b), the rate of uptake should fall off once again during the second half of the generation time when synthesis of isocitritase does occur and, therefore, the internal pool of glycine can be manufactured, at least in part, by the plant itself.

And finally, while granting that there is strong evidence from comparative biochemistry against the inclusion of free thymine in the path to de novo synthesis of DNA-thymine (REICHARD 1959), we argued: knowing that thymine does increase nuclear synthesis in *Blastocladiella* (TURIAN and CANTINO 1959), and assuming that either the pyrimidine ring (see reviews by DAVIDSON 1957; REICHARD 1959; BUCHANAN and HARTMAN 1959) or/and the methyl group of thymine can originate from glycine (ELWYN and SPRINSON 1954; see also ALLFREY et al. 1955, and REICHARD 1959), uptake of glycine-2- C^{14} by nearly-mature, light-incubated plants should lead to a detectable pool of labeled DNA, while incubation of similar plants in the dark should induce less uptake of glycine-2- C^{14} and, accordingly, less accumulation of radioactivity in DNA.

Materials and Methods

For studies of glycine uptake during growth, we used the synthetic medium D (glucose, glutamate, methionine, thiamine, salts) of BARNER and CANTINO (1952), but with glucose at a reduced level ($2.2 \cdot 10^{-3}$ M). Glycine (10^{-2} M) was included, and the solution was sterilized by filtration. The medium was inoculated with washed, motile spores (10^7 spores/50 ml. of synthetic medium), the swarmers being prepared according to McCURDY and CANTINO (1960). Cultures were incubated in light (ca. 400 f.c.) and dark at 21 C., and analyzed periodically for disappearance of glycine. Glycine was determined according to CHRISTENSEN et al. (1951; see also, ALEXANDER et al. 1945) with slight modification; using exactly three minute distillation periods, linear relationships between glycine concentration and optical density at 575 m μ were obtained from zero to 2.4 μ g of glycine-nitrogen. Calculations of per-plant data for these and other experiments was made according to the methods of McCURDY and CANTINO (1960) and LOVETT and CANTINO (1960).

For incubation experiments with pre-formed, non-growing plants, we first grew synchronous, single-generation cultures of O.C. plants ($4 \cdot 10^7$ to $3 \cdot 10^8$ plants/liter in the various experiments) according to McCURDY and CANTINO (1960) at 25 C. Plants were harvested, washed, their dry weights and protein content established, and then used for incubations in a glycine (10^{-2} M)-phosphate buffer (10^{-2} M, pH 6.8) medium at 21 C., with and without light (400 f.c.). The ratio of plant material to volume of glycine-phosphate buffer (as mg. protein/ml.) varied from 0.2 to 1.2; over this range, rates of glycine uptake were approximately linearly related to the amount of plant material used. Glycine uptake by such non proliferating plants was calculated on a per-plant basis, and an in vivo specific activity basis which was

defined as follows: μM glycine disappearing from the glycine-phosphate medium per gm. *Blastocladiella* protein per 3.5 hr. at 21 C. In all experiments, protein was determined with the Biuret reaction (cf. STICKLAND 1951; FINCHAM 1954), and dry weights were obtained by heating at 95 C.

Experiments with glycine-2- C^{14} (Radiochem. Center, Amersham, Buckinghamshire, England) were carried out in essentially the same manner as the incubations of non-growing plants in the phosphate buffer-glycine system described above. The final, specific activity of glycine-2- C^{14} in the incubation medium was one mc/mM. Following the incubation, plants were washed, extracted with cold 5% trichloroacetic acid three times and then defatted with chloroform-methanol mixtures and ether. The nucleic acids in the residue were separated by hydrolysis of ribonucleic acid (RNA) with 0.5 N KOH at 37 C., removal of K^+ with perchlorate, and precipitation of the DNA with 50% ethanol. For radioactivity determinations, the DNA

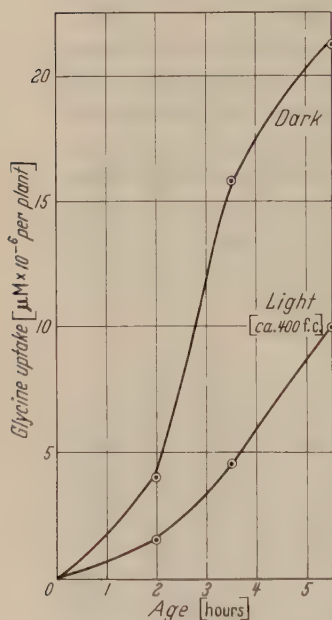
was resuspended in water and aliquots were counted directly on planchettes. The precipitated DNA fraction was hydrolyzed with 90% formic acid (WYATT 1951b) at 175 C. (adapted from MARKHAM 1955), chromatographed two-dimensionally on unwashed Whatman no.1 filter paper with isopropanol-6N HCl (65:35; WYATT 1951a), and the papers were then radioautographed (Kodak X-ray no-screen film). The thymine and cytosine were eluted with 0.1 N HCl, their absorption characteristics (220–320 $\text{m}\mu$) determined (along with appropriate blanks) and compared with those of authentic samples (both before and after chromatography in the same solvent system). The absorption curve for the cytosine recovered from *Blastocladiella* DNA was identical in all respects with that of authentic cytosine samples; that for *Blastocladiella* thymine, a reasonable facsimile of the curve for authentic thymine samples.

The source of light in all experiments was a bank of Phytor (white light type) fluorescent tubes; see STROUN et al (1959) for spectral characteristics.

Results

a) Glycine uptake during germination and growth of *O.C.* plants of *Blastocladiella* on synthetic media in light and dark

Fig. 2. Glycine uptake by "ordinary colorless" germlings of *Blastocladiella emersonii* growing at 21 C. in light and dark on synthetic medium D



On the synthetic medium, growth is slower than on the more complex medium PYG (Difco "Cantino PYG Broth", containing peptone, yeast extract, glucose); at 21 C., a five hour synchronized culture consists of germlings which have undergone only one nuclear division. During this early period in ontogeny, glycine disappears from the medium about twice as fast in the dark as in the light (Fig. 2), the average uptake per hour being about $4 \cdot 10^{-6} \mu\text{Mol}$ glycine per plant in the dark, and $1 \cdot 10^{-6} \mu\text{Mol}$ per plant under 400 f.c. of light.

b) *Glycine uptake by pre-formed non-growing O.C. plants at different stages in ontogeny*

1. *Young plants (see "A", Fig. 1)*

When pre-formed, washed plants (from synchronous, single generation cultures of *Blastocladiella* at 40% of their generation time) are bathed in a glycine-phosphate buffer system for 3½ hours in light and dark, the glycine uptake per plant and the in vivo specific activity of these plants

Table 1. *The effect of light (400 j.c.) and atmospheric CO₂ upon the uptake of glycine by non-growing O.C. plants at 40% of their generation time*

Glycine uptake (3.5 hr., 21 C.)	Dark, under air	Light, under air	Light, under CO ₂ free air
Activity per plant (μM glycine)	10.7 · 10 ⁻⁶	1.3 · 10 ⁻⁶	9.2 · 10 ⁻⁶
In vivo specific activity (μM glycine/ gm. <i>Blastocladiella</i> protein)	1110	92	948

are, respectively, ca. 8 and 10 times greater in the dark than under conditions of illumination (Table 1). However, when CO₂ is eliminated (with KOH trap) from the illuminated suspension, both the uptake levels per plant and the in vivo specific activities increase once again to the levels of the dark-incubated controls (Table 1).

2. *Mature plants (see "B", Fig. 1)*

When nearly-mature (ca. 85% of their generation time), preformed, non-growing plants are studied as in the preceding experiment, the in vivo specific activity of these much older plants for glycine uptake in the dark is only about 5% (Table 2) of the activity of the younger plants (Table 1). The fact that the activity *per plant* (as compared to the in vivo

Table 2. *The effect of light upon the uptake of glycine by non growing O.C. plants of Blastocladiella at 85% of their generation time*

Glycine uptake (3.5 hr., 21 C.)	Dark	Light
Activity per plant (μM glycine)	5 · 10 ⁻⁶	67 · 10 ⁻⁶
In vivo specific activity (μM glycine/gm. <i>Blastocladiella</i> protein)	50	870

specific activity) is as high as it is — i.e., about one half of that for young thalli — is understandable, for the nearly-mature plant is much greater in total volume and surface area than the immature plant with which it is being compared. When such plants are incubated in the light, the in vivo specific activity for glycine uptake rises sharply about 17 fold, and the activity per plant about 13 fold (Table 2).

c) The relation between glycine uptake and synthesis of isocitritase by pre-formed non-growing plants at different stages in ontogeny

The capacity of non-growing plants to absorb glycine in the dark rises sharply during the period in ontogeny when the isocitritase content per plant is being diluted out (MCCURDY and CANTINO 1960) as a consequence of the rapid growth of the protoplast without net synthesis of the enzyme (Fig. 3). On the other hand, this capacity for glycine uptake drops sharply once again (Fig. 3) as the plants reach the stage in development where

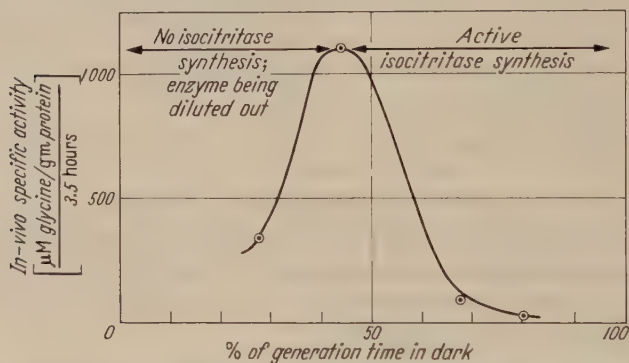


Fig. 3. Glycine uptake in the dark at 21 C. by pre-formed non-growing "ordinary colorless" plants of *Blastocladiella emersonii* at different stages in ontogeny

rapid synthesis of isocitritase (one of several "adaptive" enzymes in *Blastocladiella*; cf. CANTINO 1961; LOVETT and CANTINO 1961) is known to occur (MCCURDY and CANTINO 1960).

d) Experiments with glycine-2-C¹⁴

Preformed, 8½ hour plants (70% of their generation time; i.e., approaching maturity), derived from synchronous cultures, were incubated in light and dark in a 10 ml. mixture of phosphate and radioactive glycine-2-C¹⁴ for two hours at 21 C. (see Materials and Methods). Analyses for total radioactivity appearing in the DNA fraction revealed that such plants contain labeled DNA, and that more accumulates in the light than in the dark (Table 3).

The total complement of cytosine and thymine in the formic acid hydrolysates of the DNA was isolated by elution with HCl (pH 1) following chromatography, and determined quantitatively at 275 mμ and 265 mμ, respectively. The good correspondence between (a), the ratio of the total, radioactive DNA fraction recovered from light and dark incubated plants, and (b), the ratio of the total pyrimidine pool recovered from light and dark incubated plants under these same conditions (see com-

parative data in Table 4) shows that the light-induced increase in radioactive DNA probably reflects, in the main, an increase in net synthesis of DNA.

Finally, in connection with these experiments, our chromatograms revealed an unexpected result: while the thymine and cytosine areas of the chromatogram of the DNA hydrolysate were labeled, the adenine and guanine possessed little if any detectable radioactivity. Thus, these results on the labeling of both pyrimidines in *Blastocladiella* are not inconsistent with observations (COHEN, KORNBERG, BLAKELY etc.; see DAVIDSON 1957) that the thymine ring may arise from cytidine.

But, in view of the literature on nucleic acid synthesis, particularly the role of glycine in the formation of glycinamide ribotide, we had also expected to find the purines labeled (cf. work of BUCHANAN, SHEMIN, ABRAMS, GREENBERG, KORNBERG, and co-workers; reviewed in DAVIDSON 1957; BUCHANAN and HARTMAN 1959). Further work will be done to clarify this

Table 3

The effect of light upon incorporation of C¹⁴ (from glycine-2-C¹⁴) into DNA by 8½ hr. O.C. plants of Blastocladiella during a 2 hr. incubation at 21°C

Age of Plants	Radioactivity (counts minute under prevailing conditions) incorporated into DNA per mg. <i>Blastocladiella</i> protein		
	Light	Dark	Dark/Light (%)
8½ hr. (ca. 70% of dark generation time)	35.8 ¹	26.1 ¹	73

¹ Actual counting rate on samples measured: several hundred counts/min.

Table 4. *Comparison of (1), the total pool of DNA-thymine and DNA-cytosine recovered from light- and dark-incubated 8½ hr. plants, and (2), the total amount of radioactive DNA produced under these same conditions*

	Thymine		Cytosine ¹	
	Dark	Light	Dark	Light
(A) Total μ M per mg. <i>Blastocladiella</i> protein ($\times 10^3$)	4.7	5.9	4.3	6.8
(B) Dark/Light, from line (A), above (%)	80		63	
(C) Average for thymine + cytosine from line (B) above (%)	72			
(D) Labeled DNA (dark)/labeled DNA (light); from table 3 (%)	73			

¹ The mobility (rf) of glycine in the isopropanol-HCl system used for chromatography of nucleic acid bases is almost identical with that of cytosine. In some of our experiments, small amounts of glycine escaped the various fractionation and purification procedures and became attached to the precipitated DNA in such a way that it could not subsequently be removed by simple washing procedures. Thus, accurate determinations of the specific radioactivity of cytosine and thymine were postponed pending continuation of our studies.

situation. In any event, we do not know if the absence of radioactivity in the purines has some bearing upon the mechanism of light stimulated growth and nucleic acid synthesis in *Blastocladiella*. But, aside from this, and the fact that at this point a further discussion of these preliminary, in vivo experiments with radioactive glycine would be unwarranted and decidedly premature, the labelling pattern for DNA synthesis from glycine-2-C¹⁴ by *Blastocladiella* may turn out to be somewhat different from that established thus far by other workers for various organisms and tissues.

That these results with *Blastocladiella* may be of some general significance stems from observations we have made with the closely related, but morphologically distinct, filamentous water mould, *Allomyces*. A male mutant of *A. macrogynus*, incubated in glycine-2-C¹⁴ under conditions essentially identical with those used for *B. emersonii*, accumulates labeled DNA in which the radioactivity also appears to be located almost exclusively in the pyrimidines. Perhaps the *Blastocladiales*, which appear to be among the most primitive of the true fungi, display a distinctive type of nucleic acid metabolism.

Discussion

The data in this report provide additional in vivo evidence consistent with our present interpretation of light-stimulated growth by the "ordinary colorless", carotenoid-free plants of the aquatic Phycomycete, *Blastocladiella emersonii*. In particular, they reveal that:

a) The magnitude of glycine uptake during development in the dark is inversely related to the activity of the "bottleneck" enzyme, isocitritase, which (in conjunction with a glycine-alanine transaminase) provides *Blastocladiella* with an internal pool of glycine available for synthesis of nucleic acid.

b) The magnitude of glycine uptake is depressed by light under conditions (i.e., young plants) where illumination increases the rate of the reaction chain which starts with CO₂ fixation via ketoglutarate and presumably leads to increased production of the internal glycine pool; thus, light apparently reduces the organism's requirement for an exogenous supply of glycine. In the absence of CO₂, the light effect on glycine uptake is totally eliminated.

c) Glycine uptake is accelerated by light under those conditions (i.e., nearly mature plants) where nuclear division and DNA synthesis have almost come to a halt in the dark but are induced to continue once again if plants are illuminated.

d) Uptake of glycine-2-C¹⁴ by nearly mature plants leads to the formation of labeled DNA, more being produced in the light than in the

dark; this appears to be due, in the main, to a light-induced increase in net synthesis of DNA rather than an increase in the specific radioactivity of DNA.

e) While the C^{14} -labeled DNA isolated from light- and dark-incubated plants contains radioactive pyrimidines, little if any activity is found in adenine and guanine; the bearing of this particular observation on "lumi-synthesis" (light-stimulated growth) and light-stimulated nucleic acid metabolism in *Blastocladiella* is, at present, a moot point, and is being studied further.

In view of these results, and our earlier experiments which have shown that either thymine (or thymidine, but not uracil), or an equimolar mixture of succinate and glyoxylate, will substitute in vivo for the stimulatory effect of light, it seems most likely that the locus of the light effect must lie somewhere near the beginning of the chain of reactions leading from carboxylation of ketoglutarate to isocitrate (isocitric dehydrogenase), cleavage of isocitrate to succinate and glyoxylate (isocitritase), transamination of the latter to glycine (glycine-alanine transaminase), and the metabolism of some of the glycine in such a way that additional deoxythymidine and/or deoxycytidine are produced and lead to increased quantities of DNA. The way in which radiant energy speeds up the initial carboxylation remains to be established.

Résumé

Les plantules de *Blastocladiella emersonii* prélevées de cultures synchrones puis incubées en présence de glycine à la lumière absorbent, par comparaison avec celles maintenues à l'obscurité: a) moins de glycine lors de leur première phase de développement (à faible activité isocitritasique); b) plus de glycine lors de leur deuxième phase de croissance et multiplication nucléaire prolongées (à forte activité isocitritasique). Ces effets s'annulent en absence de CO_2 .

Incubées en présence de glycine-2- C^{14} , les plantules dans leur 2^{ème} phase de développement (b) ont accumulé davantage de radioactivité dans leur acide désoxyribonucléique (ADN) à la lumière qu'à l'obscurité.

Les radio-chromatogrames d'ADN hydrolysé ont révélé que le C^{14} était essentiellement incorporé dans les bases pyrimidiques, cytosine et thymine.

This work was carried on at the Institut de Botanique générale, Université de Genève, with financial support from the Commission atomique suisse, and the Fonds national suisse de la Recherche scientifique. One of us (E.C.C.) received additional support from the National Science Foundation, U.S.A.; he also wishes to thank the Director of the Institute, Professor F. CHODAT, for his hospitality. The writers are also grateful to Miss H. WEIFFENBACH for her conscientious technical assistance.

Bibliography

- ALEXANDER, B., G. LANDEWEHR and A. M. SELIGMAN: *J. biol. Chem.* **160**, 51 (1945).
 ALLFREY, V. G., A. E. MIRSKY and H. STERN: *Advanc. Enzymol.* **16**, 411 (1955).
 BARNER, H. D., and E. C. CANTINO: *Amer. J. Bot.* **39**, 746 (1952).
 BUCHANAN, J. M., and S. C. HARTMAN: *Advanc. Enzymol.* **21**, 199 (1959).
 CANTINO, E. C.: *J. gen. Microbiol.* (in press) (1961).
 CANTINO, E. C.: *Dev. Biol.* **1**, 396 (1959).
 CANTINO, E. C., and E. A. HORENSTEIN: *Mycologia (N. Y.)* **48**, 777 (1956); **49**, 892 (1957).
 CANTINO, E. C., and E. A. HORENSTEIN: *Physiol. Plantarum* **12**, 251 (1959).
 CANTINO, E. C., and G. F. TURIAN: *Ann. Rev. Microbiol.* **13**, 97 (1959).
 CHRISTENSEN, H. N., T. R. RIGGS and N. E. RAY: *Analyt. Chem.* **23**, 1521 (1951).
 DAVIDSON, J. N.: *The biochemistry of the nucleic acids*. 3 ed. London: Methuen & Co., Ltd. 1957.
 ELWYN, D., and D. B. SPRINSON: *J. biol. Chem.* **207**, 467 (1954).
 FINCHAM, R. S.: *J. gen. Microbiol.* **11**, 236 (1954).
 LOVETT, J. S., and E. C. CANTINO: *J. gen. Microbiol.* (in press) (1961).
 LOVETT, J. S., and E. C. CANTINO: *Amer. J. Bot.* **47**, 550 (1960).
 MARKHAM, R.: *Modern Methods of Plant Analysis*. **15**, 246 (1955).
 MCCURDY, H., and E. C. CANTINO: *Plant Physiol.* **35**, 463 (1960).
 REICHARD, P.: *Advanc. Enzymol.* **21**, 263 (1959).
 STICKLAND, H. L.: *J. gen. Microbiol.* **5**, 698 (1951).
 STROUN, M., J. F. SCHOPFER et F. CHODAT: *Bull. Soc. bot. France* **106**, 309 (1959).
 TURIAN, G., and E. C. CANTINO: *J. gen. Microbiol.* **21**, 721 (1959).
 WYATT, G. R.: *Biochem. J.* **48**, 581 (1951 a); **48**, 584 (1951 b).

Department of Botany, Faculty of Science, University of Cairo

Effect of Dihydrostreptomycin on the Growth and Carbohydrate Metabolism of Mycelial Mats of *Rhizoctonia solani*

By

M. K. TOLBA and A. M. SALAMA

With 1 Figure in the text

(Received September 23, 1960)

The literature dealing with the use of streptomycin and other antibiotics against various plant diseases have been ably chronicled by ANDERSON and GOTTLIEB (1952), and more recently by LEBAN and KEITT (1954). The effect of streptomycin on the growth of fungi, bacteria and higher plant tissues is quite variable. Thus, while ROESSLER et al. (1946), LITTMAN et al. (1948) and others reported that streptomycin has negligible inhibitory effect on the growth of various fungal species, McKEEN (1949), GRAY (1955) and other investigators observed strong inhibition of growth and activities of various fungi and higher plant tissues by streptomycin. DONOVICK and RAKE (1947) reported that the activity of dihydrostreptomycin against the usual test organisms and its toxicity were similar to those of streptomycin. Similar conclusions were reached by GRAY (1955).

I. Material and Methods

In this investigation 24 mycelial mats of *Rhizoctonia solani* were prepared in the way described in a previous paper (TOLBA and SALAMA 1960). Four samples were oven-dried and used for the determination of the initial dry weight and carbohydrate contents of the mats. The remaining twenty samples were distributed in the following way:

4 samples: suspended over sterile distilled water.

4 samples: suspended over 100 ml medium A

4 samples: suspended over 100 ml medium A containing 100 p.p.m. dihydrostreptomycin sulphate.

4 samples: suspended over 100 ml medium A containing 1000 p.p.m. dihydrostreptomycin sulphate.

4 samples: suspended over 100 ml medium A containing 2000 p.p.m. dihydrostreptomycin sulphate.

Immediately after addition of the fresh culture media 50 ml. were pipetted from each flask, their p_H -values determined and then analysed for their actual sugar contents after coming in contact with the wet mats. The initial p_H -value of the various media was 5.2. Such p_H -value remained fairly constant all over the whole experimental period.

The culture flasks were incubated at 28°C for a period of 48 hours during which analyses of the various culture media and determination of carbon dioxide-output as well as mycelial dry weight were carried out at 24 hour intervals. At the expiry of the experimental period the mycelial mats were analysed for their contents of the various carbohydrate fractions.

II. Experimental Results

1. Analysis of the media

From the results of the analysis of the various media for their sugar contents the amounts of sugar taken up from, and reducing sugars released in the culture media are calculated and presented in Table 1. Table 1 shows that:

1. The presence of dihydrostreptomycin in the culture medium intensified the utilisation of sucrose (sugar uptake + reducing sugars released in the medium) by the mycelial mats throughout the 48 hours of the experiment. This effect increased with the increase in concentration of the antibiotic in the medium.

2. The amounts of reducing sugars released in the culture media increased with the increase in concentration of dihydrostreptomycin particularly during the second 24 hours of the experiment. Sugar uptake was not affected to any appreciable extent by the inclusion in the culture medium of 100 p.p.m. dihydrostreptomycin but was decreased and increased during the 1st and 2nd 24 hours of the experiment respectively by addition of streptomycin in concentrations higher than 100 p.p.m.

3. The mycelial mats suspended over medium A absorbed more glucose than fructose throughout the 48 hours of the experiment. Addition of streptomycin to the medium resulted in higher uptake from fructose than from glucose during the 1st 24 hours. The normal trend was again resumed during the 2nd 24 hours of the experiment but the total uptake from fructose in 48 hours was somewhat higher than from glucose.

2. Analysis of the mycelial mats

The average values of the results of the analysis of the variously treated mycelial mats are presented in Table 2 which shows that:

1. Mycelial mats suspended over media containing the various concentrations of dihydrostreptomycin revealed higher values of total carbohydrate contents over the control samples. However, on calculating the amounts of carbohydrates synthesised by the variously treated mycelial mats as per cent sugar uptake from the corresponding media in 48 hours the values obtained were 22.7%, 32.5%, 25.7% and 23.2% in media containing 0, 100, 1000 and 2000 p.p.m. dihydrostreptomycin sulphate respectively. It can thus be seen that the presence of the antibiotic in low concentration (100 p.p.m.) accentuated the process of carbohydrate

Table 1. Sugar Uptake from and Reducing Sugars Released in Culture Media of *Rhiz. solani* Containing Various Concentrations of Dihydrostreptomycin Sulphate (Expressed as mgms sugar/mat)

Concentration of antibiotic in the medium p.p.m.	Feeding Period											
	1st 24 hours				2nd 24 hours				48 hours			
	Uptake from glucose	Uptake from fructose	Total sugar uptake	Reducing sugars released in medium	Uptake from glucose	Uptake from fructose	Total sugar uptake	Reducing sugars released in medium	Uptake from glucose	Uptake from fructose	Total sugar uptake	Reducing sugars released in medium
(0) Control	82	70	152	165	88	68	156	36	170	138	308	201
100	57	98	155	201	87	69	156	84	144	167	311	285
1000	40	105	145	201	130	86	216	120	170	191	361	321
2000	38	89	127	237	156	132	288	144	204	211	415	381

Table 2. Analysis of Mycelial Mats of *Rhiz. solani* Suspended for 48 Hours over Culture Media Containing Various Concentrations of Dihydrostreptomycin Sulphate for their Contents of the Various Carbohydrate Fractions (Expressed as mgms sugar/mat)

Treatment of mycelial mats	Carbohydrates in alcohol extract							Poly-saccharides	Total carbo-hydrate
	Hexoses				Disaccharides		Total soluble sugars		
	Glucose	Fructose	Non-fermentable	Total hexoses	Sucrose	Other disaccharides			
Initials	0.1	0.4	0.0	0.5	0.4	37.3	38.2	140.0	178.2
Starved on sterile distilled water	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	18.3	18.4	80.9	99.3
Fed with medium A	0.4	0.0	0.0	0.4	0.0	56.8	57.2	190.9	248.1
Fed with medium A + 100 p.p.m. streptomycin	0.7	0.0	0.0	0.7	0.0	72.7	37.4	206.3	279.7
Fed with medium A + 1000 p.p.m. streptomycin	0.6	0.0	0.0	0.6	0.0	74.1	74.7	196.2	270.9
Fed with medium A + 2000 p.p.m. streptomycin	0.9	0.0	0.0	0.9	0.0	71.1	72.0	202.4	274.4

synthesis by the mycelial mats. Such activating effect gradually diminished with the increase in concentration of streptomycin, but no inhibitory effects on this process were observed when the antibiotic was introduced into the medium at a concentration as high as 2000 p.p.m.

2. The increase in total carbohydrate content of the mycelial mats in presence of streptomycin over the controls was shared by both polysaccharides and soluble sugars.

3. The changes in soluble sugars are almost wholly due to changes in the "other disaccharides" fraction, sucrose being almost completely absent and hexoses showing only minute variations.

3. Carbon dioxide-output by the mycelial mats

The average values of the amounts of CO_2 given off by the variously treated mycelial mats are plotted graphically in Fig. 1 which shows that mycelial mats fed with media containing various concentrations of dihydro-

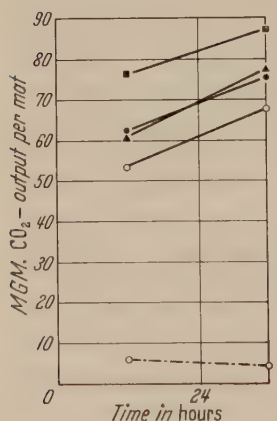


Fig. 1. Carbon dioxide-output by mycelial mats of *Rhiz. solani* starved on sterile distilled water or fed with nutrient media containing various concentrations of dihydrostreptomycin sulphate. ○—○ Sterile distilled water; ○—○ Medium A; ●—● Medium A + 100 p.p.m. streptomycin; ▲—▲ Medium A + 1000 p.p.m. streptomycin; ■—■ Medium A + 2000 p.p.m. streptomycin

streptomycin respired at a high rate than the control samples throughout the 48 hours of the experiment. The high rate of respiration of the former mats during the 48 hours of the experiment was not always accompanied by a high sugar uptake. On the contrary, these mats absorbed less amounts of sugar from their media than the control mats during the first 24 hours of the experiment. It may be mentioned, however, that all mats suspended over media containing the antibiotic absorbed more fructose than the controls during this experimental period. None of the absorbed fructose was recovered in the mats at the end of 48 hours. A close correlation between fructose content of the mats and respiration rate has been observed by SAID and K. NAGUIB (1953) in case of mycelial mats of *Fusarium moniliforme*.

4. Mycelial dry weight

The average values of the dry weights of the variously treated mycelial mats are contained in Table 3. Statistical analysis of the results in Table 3 showed that mycelial mats suspended over media containing the various concentrations of dihydrostreptomycin sulphate revealed a statistically significant increase in their dry weights over the control samples by the end of the 48 hours of the experiment. At the end of the 1st 24 hours, the

dry weight of the mycelial mats decreased with the increase in concentration of streptomycin in the medium but was still significantly higher in media containing 100 and 1000 p. p. m. of the antibiotic than in the control medium.

Table 3. *Dry Weights of Mycelial Mats of Rhiz. solani Suspended over Culture Media Containing Different Concentrations of Dihydrostreptomycin Sulphate*
(Expressed in mgms)

Feeding Medium	Initial dry weight	Dry weight at the end of	
		24 hours	48 hours
Sterile distilled water	385 ± 32.5	360 ± 11.3	251 ± 15.6
Medium A		512 ± 9.2	615 ± 7.1
Medium A + 100 p.p.m. Dihydrostreptomycin		641 ± 14.1	679 ± 12.7
Medium A + 1000 p.p.m. Dihydrostreptomycin		545 ± 21.2	648 ± 31.1
Medium A + 2000 p.p.m. Dihydrostreptomycin		435 ± 7.1	750 ± 42.4

III. Discussion

The main conclusion reached from the results reported in this paper is that dihydrostreptomycin failed, even at a concentration of 2000 p. p. m. to induce any appreciable inhibitory action on the growth of mycelial mats of the test fungus. On the contrary, the two concentrations 100 and 1000 p. p. m. enhanced growth during the 48 hours of the experiment. The highest concentration used (2000 p. p. m.), although slightly inhibited growth during the 1st 24 hours, enhanced growth to a considerable extent during the 2nd 24 hours of the experiment with the net result that the final dry weight at the end of the experimental period was higher in cases of the latter concentration than in media containing lower concentrations of the antibiotic as well as in the control medium. It may be mentioned in this respect that several investigators (ROBINSON et al. 1944; ROESSLER et al. 1946; SEABURY and ARTIS 1946; MEYER and ORDAL 1946; LITTMAN 1947; LITTMAN et al. 1948) reported that streptomycin has a negligible inhibitory effect on the growth of various fungal species. LOEFER et al. (1952) studied the effect of different concentrations of streptomycin in two types of media on the growth of 17 strains of fungi and reported either inhibition or enhancement with 8 of them. Using a commercial preparation of streptomycin, CAMPBELL and SASLAW (1949) found that 0.01 to 5 mgm/cc enhanced the growth of several fungal species.

The failure of dihydrostreptomycin sulphate to induce inhibitory effects on the growth of mycelial mats of the test fungus may be due to the ability of the fungal cells to degrade the antibiotic and use it as sources

of carbon and nitrogen. Cases of utilisation of various fungistatic and fungicidal substances (e.g. actidione, salicylic acid, arsenites, arsenates, desthiobiotin and creosote) by fungi including species of *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Hormodendrum*, and *Saccharomyces* were reported by RIÉRE (1940), CHRISTENSEN et al. (1942), CHALLENGER (1945), JENSEN (1946), STAKMAN et al. (1946), WILSON (1947), WALKER and SMITH (1952), WOOLLEY (1952), MARSDEN (1954) and several other investigators.

Summary

Dihydrostreptomycin failed to induce any appreciable inhibitory action on the growth of mycelial mats of *Rhizoctonia solani*. On the contrary, the two concentrations 100 and 1000 p.p.m. enhanced growth during the experimental period. The failure of dihydrostreptomycin sulphate to induce inhibitory effects on the growth of mycelial mats of the test fungus may be due to the ability of the fungal cells to degrade the antibiotic and use it as sources of carbon and nitrogen.

References

- ANDERSON, H. W., and D. GOTTLIEB: *Econ. Bot.* **6**, 294 (1952).
 CAMPBELL, C. C., and S. SASLAW: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **70**, 562 (1949).
 CHALLENGER, F.: *Chem. Rev.* **36**, 315 (1945).
 CHRISTENSEN, C. M., F. H. KAUFERT, H. SCHMITZ and J. L. ALLISON: *Amer. J. Bot.* **29**, 552 (1942).
 DONOVICK, R., and G. RAKE: *J. Bact.* **53**, 205 (1947).
 GRAY, R. A.: *Amer. J. Bot.* **42**, 327 (1955).
 JENSEN, H. L.: *Proc. Linn. Soc. N. S. Wales* **71**, 119 (1946).
 LEBEN, C., and W. KEITT: *Agric. Food Chem.* **2**, 234 (1954).
 LITTMAN, M. L.: *J. Bact.* **54**, 399 (1947).
 LITTMAN, M. L., E. H. WICKER and A. S. WARREN: *Amer. J. Path.* **24**, 399 (1948).
 LOEFER, J. B., F. W. BIEBERDORF and R. G. WEICHLEIN: *Bull. Torrey Bot. Club* **79**, 242 (1952).
 MARSDEN, D. H.: *Mycologia (N.Y.)* **46**, 161 (1954).
 MCKEAN, W. E.: *Canad. J. Res., Sect. C* **27**, 6, 284 (1949).
 MEYER, E., and Z. J. ORDAL: *J. infect. Dis.* **79**, 199 (1946).
 RIÉRE, J.: *Dyest. Repr.* **29**, 211 (1940).
 ROBINSON, H. J., and D. G. SMITH: *Science* **99**, 540 (1944).
 ROESSLER, W. G., E. J. HERBST, W. G. McCULLOUGH, R. C. MILLS and C. R. BREWER: *J. infect. Dis.* **79**, 23 (1946).
 SEABURY, J. H., and D. ARTIS: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **61**, 15 (1946).
 STAKMAN, E. C., F. V. STEVENSON and C. T. WILSON: *Phytopathology* **36**, 411 (1946).
 WALKER, A. T., and F. G. SMITH: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **81**, 556 (1952).
 WILSON, C.: *Phytopathology* **40**, 567 (1947).
 WOOLLEY, D. W.: *A study of antimetabolites*, p. 269. New York: Wiley 1952.

Dept. of Botany, Faculty of Science, University of Cairo, Egypt, U.A.R.

On the Mechanism of Sucrose Utilisation by Mycelial Felts of *Rhizoctonia solani*

II. Effects of Glucose, Fructose, Silver Nitrate, Sodium Fluoride and Preheating of Mycelial Mats on Sucrose Utilisation

By

M. K. TOLBA and A. M. SALAMA

With 2 Figures in the Text

(Eingegangen am 23. September 1960)

In a previous paper, the authors (1960) reported results, which suggest that sucrose is most probably utilised through a process of hydrolysis by a β -heterofructosidase. The experiments reported in the present work were planned to verify or disprove the above hypothesis.

I. Material and Methods

The fungus used in the present investigation was *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from damped off cotton seedlings.

The technique used for the preparation of the standard mycelial mats was a modification of that referred to by the authors in a previous paper (TOLBA and SALAMA 1957).

The methods used for the determination of the various carbohydrate fractions in the media and mycelial mats were those given by SAÏD (1941, 1945) and SAÏD and M. NAGUIB (1953).

In all the experiments here reported a basal medium of the following composition was used unless otherwise stated: KNO_3 10 gm; KH_2PO_4 5 gm; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 gm; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 gm; distilled water to 1000 ml.

II. Experimental Results

A. Effect of glucose and fructose on the utilisation of sucrose by mycelial mats of *Rhiz. solani*

In this experiment 24 mycelial mats were prepared in the usual way and distributed as follows:

4 samples: suspended over 100 ml basal medium to which 2 gms sucrose were added.

4 samples: suspended over 100 ml basal medium to which 2 gms sucrose + 2 gms glucose were added.

4 samples: suspended over 100 ml basal medium to which 2 gms sucrose + 2 gms fructose were added.

4 samples: suspended over 100 ml basal medium to which 2 gms sucrose + 5 gms glucose were added.

4 samples: suspended over 100 ml basal medium to which 2 gms sucrose + 5 gms fructose were added.

4 samples: suspended over 100 ml basal medium to which 2 gms sucrose + 2.5 gms glucose + 2.5 gms fructose were added.

The pH -values of the various culture media after autoclaving were 5.2. The pH -values shifted towards near neutrality by the end of 1st 24 hours and then remained almost constant for the rest of the experimental period.

Culture media were analysed immediately after coming in contact with the wet mycelial mats for their actual initial sugar contents.

Culture flasks were incubated at $28^{\circ}C$ for 48 hours during which analysis of the various media was carried out at 24 hour intervals.

From the results of the analysis of the various media the amounts of sugar taken up by the mycelial mats from the various media are

Table 1. *Sugar Uptake by Mycelial Mats of Rhiz. solani from Culture Media Containing Sucrose or Mixtures of Sucrose and Glucose, Sucrose and Fructose or Sucrose, Glucose and Fructose*
(Expressed as mgms sugar per mat)

Sugar or sugars in feeding medium	Sugar uptake in		
	1st 24 hours	2nd 24 hours	48 hours
2% sucrose	312	48	360
2% sucrose + 2% glucose	408	96	504
2% sucrose + 2% fructose	408	72	480
2% sucrose + 5% glucose	600	0.0	600
2% sucrose + 5% fructose	600	0.0	600
2% sucrose + 2.5% glucose + 2.5% fructose	420	180	600

calculated and set out in Table 1 which shows that increasing the concentration of sugar in the medium was accompanied by an increase in sugar uptake irrespective of the nature of the sugar used. This result refutes the possibility of any toxic action of the high concentrations of sugars used on the vital activities of the mycelial mats. It may be mentioned, however, that the increase in sugar uptake is not proportional to the increase in sugar concentration of the culture medium.

The amounts of sucrose utilised (amounts which disappeared from the various culture media being taken up by the mycelial mats or recovered in the media as hydrolysis products) are calculated and presented in Table 2. This Table shows that the presence of glucose or fructose in the culture medium at a concentration of 2% as well as their presence in mixture at a concentration of 2.5% each failed to induce any retarding effect on the utilisation of sucrose. Increasing the concentration of either sugar to 5% was accompanied by a marked reduction in the amounts of sucrose utilised. No appreciable difference can be observed in the effect of either sugar when present at a concentration of 5% on sucrose utilisation

since in both cases about 40—50% of the initially present sucrose was utilised by the mats during the 1st 24 hours with no further utilisation of sucrose in the 2nd 24 hours of the experiment. For the sake of comparison it may be stated that about 90—97% of the initially present sucrose was utilised in 48 hours by mycelial mats furnished with sucrose alone or a mixture of 2% sucrose and 2% glucose or fructose.

If a specific sucrose phosphorylase enzyme was responsible for sucrose utilisation by the mycelial mats of the test fungus, one would have expected much greater reduction in the utilisation of sucrose in presence of glucose than fructose, the former being a strong competitive inhibitor of sucrose phosphorylase (DOUDOROFF 1945). Such effect was not revealed by the results of the present experiment.

The marked reduction in sucrose utilisation in presence of high concentrations (5%) of glucose or fructose may be explained by assuming that, under such conditions, the mycelial mats preferentially absorbed the monosaccharides. The slightly greater retardation of sucrose utilisation in presence of 5% glucose than in presence of an equivalent concentration of fructose is, most probably, due

Table 2. *Amounts of Sucrose Utilised by Mycelial Mats of Rhiz. solani as Affected by the Inclusion in the Culture Medium of Various Concentrations of Glucose or Fructose either Singly or in Mixture (Expressed as mgms sugar per mat)*

Sugar or sugars in feeding medium	Sucrose utilised in		
	1st 24 hours	2nd 24 hours	48 hours
2% sucrose	862	23	885
2% sucrose + 2% glucose	696	216	912
2% sucrose + 2% fructose	936	24	960
2% sucrose + 5% glucose	360	0	360
2% sucrose + 5% fructose	520	0	520
2% sucrose + 2.5% glucose + 2.5% fructose	650	310	960

to varied degrees of the preferential absorption of the two hexoses from their mixtures with the disaccharide sucrose. It may be recalled here that the results presented in a previous paper (TOLBA and SALAMA 1960) revealed that mycelial mats of the test fungus invariably absorbed more glucose than fructose when equivalent concentrations of these sugars were present singly in their culture media.

From the foregoing discussion of the results it may be postulated that sucrose utilisation by mycelial mats of *Rhiz. solani* is mediated by a fructofuranosidase enzyme which effects the hydrolysis of sucrose in the culture medium into glucose and fructose.

It may be possible however that the suggested fructofuranosidase enzyme is a surface enzyme which hydrolyses sucrose in excess to the required amounts for uptake, but the presence of high concentrations of glucose or fructose, either of which being the product of sucrose hydrolysis, would naturally retard the forward hydrolytic reaction.

B. Effect of preheating mycelial mats of Rhiz. solani at 75° and 100° C on their ability to utilise sucrose

Heat treatment of the mycelial mats kills the protoplasm and accordingly would abolish the ability of the mats to absorb sugars. If sucrose utilisation is mediated by a specific sucrose phosphorylase enzyme then the effect of preheating would reveal itself in a reduction of the amounts of sucrose utilised, due, firstly, to the abolished uptake and, secondly, to a reduction in the activity of the already present invertase enzyme. The latter was reported by NEUBERG and MANDL (1950) to lose about 50 % of its activity in solution by heating to 60° C. On the other hand, if a fructofuranosidase enzyme is wholly responsible for the breakdown of sucrose then the reduction in utilisation would be solely due to the partial deactivation of the enzyme. To elucidate this point pairs of mycelial mats were treated as follows:

2 samples: floated over sterile distilled water at 28° C for 24 hours.

2 samples: floated over sterile distilled water at 75° C for 24 hours.

2 samples: floated over sterile distilled water at 100° C for 2 hours.

Sterile water was decanted off after the various pretreatments and the mycelial mats were then floated over the nutrient medium containing 2% sucrose and reincubated at 28° C for 48 hours. The media were analysed for their initial and final sugar contents and the results are presented in Table 3.

The results in Table 3 show that heating the mycelial mats at 75° or 100° C resulted in a considerable reduction in the amounts of sucrose utilised by the mats when compared to the control samples.

Table 3. *Effect of Preheating Mycelial Mats of Rhiz. solani at 75° and 100° C on their Ability to Utilise Sucrose*

Treatment of mycelial mats	Sugar uptake in 48 hours mgms/mat	Reducing sugars appearing in the medium in 48 hrs mgms/mat	Total sucrose utilisation in 48 hours mgms/mat	% reduction in sucrose utilisation
Controls (28° C)	654	310	964	—
Preheated at 75° C	105	454	559	42.0
Preheated at 100° C	—	312	312	67.6

It might be argued, however, that the reducing sugars appearing in the medium through the action of surface invertase enzyme were not much different under the various experimental conditions and hence the reduction in total sucrose utilisation would be simply due to stoppage of sugar

uptake which is separately mediated by a specific sucrose phosphorylase, but it would be rather difficult to conceive of the fact that heating the mats to 75° or 100°C induced no appreciable inactivation of the surface invertase enzyme.

A test was made for the effect of heating 1 % invertase enzyme solutions to 75° or 100°C for a period of 10 min on their powers to hydrolyse a 2 % sucrose solution. The results obtained showed that the amounts of sucrose hydrolysed by the enzyme solutions at 75° and 100°C were 190 and 70 mgm respectively as compared to 420 mgm by the unheated control enzyme. The above results reveal that heating the invertase enzyme to 75° and 100°C led a 54.7 % and 83.3 % reduction in the amounts of sucrose hydrolysed respectively. Such result would uphold the view that the reduction in total sucrose utilisation by heated mycelial mats cannot be attributed to stoppage of uptake only. This result, coupled with the fact that heating to 75°C appreciably diminished uptake but increased the rate of production of reducing sugars, would shake the belief in the possible mediation of a specific sucrose phosphorylase in the utilisation of sucrose by mycelial mats of the test fungus.

C. Effect of AgNO₃ upon uptake from and inversion of sucrose by mycelial mats of Rhiz. solani

In this test 10 mycelial mats were prepared in the usual way and distributed as follows:

- 2 samples: fed with 100 ml each of the nutrient medium containing 2 % sucrose.
- 2 samples: fed with 100 ml each of the nutrient medium containing 2 % sucrose to which 10⁻⁶ M silver nitrate was added.
- 2 samples: fed with 100 ml each of the nutrient medium containing 2 % sucrose to which 10⁻⁵ M silver nitrate was added.
- 2 samples: fed with 100 ml each of the nutrient medium containing 2 % sucrose to which 10⁻⁴ M silver nitrate was added.
- 2 samples: fed with 100 ml each of the nutrient medium containing 2 % sucrose to which 10⁻³ M silver nitrate was added.

Culture flasks were incubated at 28°C for 48 hours at the end of which the various media together with the respective initials were analysed for their direct and total reducing values. The results are represented graphically in Fig.1 which shows that silver nitrate has a greater inhibiting effect upon sugar absorption from sucrose-containing media than upon inversion. This is in direct contrast to the results of RHEINHOLD (1947) who found that reducing sugar production by carrot discs on sucrose was inhibited by 10⁻⁶ M silver nitrate, but is completely confirmatory to the findings of HARLEY and SMITH (1956) who reported that silver nitrate at concentrations of 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M inhibited uptake of sucrose by *Peltigera polydactyla* whilst the amounts of reducing sugars appearing in the media were greatly stimulated. Fig.1 also shows that silver nitrate at

concentrations of 10^{-6} and 10^{-5} M induced slight inhibition and slight stimulation of the uptake from and inversion of sucrose respectively. At a concentration of 10^{-4} M, silver nitrate strongly inhibited the uptake, but the production of reducing sugars in the medium was greatly stimulated.



Fig. 1. Effect of silver nitrate upon uptake from and inversion of sucrose by mycelial mats of *Rhiz. solani*. Total sucrose utilisation Δ — Δ ; reducing sugars appearing in the medium \square — \square ; sugar uptake \circ — \circ .

When present in a concentration of 10^{-3} , silver nitrate considerably reduced both uptake and inversion.

The above results show that inhibition of absorption may increase the quantity of reducing sugars released and suggest that the two processes of absorption and inversion are essentially independent, thus lending a strong supporting evidence to the view that sucrose is first hydrolysed before it is taken by mycelial mats of the test fungus.

D. Effect of sodium fluoride on the utilisation of sucrose by mycelial mats of Rhiz. solani

The differential inhibition of absorption and inversion of sucrose by mycelial mats of *Rhiz. solani* was studied using sodium fluoride. This inhibitor was chosen in preference to sodium azide which was used by MANDELS (1951 and 1954) since it has, unlike azide, no effect on oxidase systems.

Phloridzin, used by STREET and LOWE (1950), was reported by HARLEY and SMITH (1956) to have the particular disadvantage of affecting sucrose analysis.

Ten mycelial mats were prepared and distributed as follows:

2 samples: fed with the nutrient medium containing 2% sucrose.

2 samples: fed with the nutrient medium containing 2% sucrose to which 2 mM sodium fluoride were added.

2 samples: fed with the nutrient medium containing 2% sucrose to which 10 mM sodium fluoride were added.

2 samples: fed with the nutrient medium containing 2% sucrose to which 20 mM sodium fluoride were added.

2 samples: fed with the nutrient medium containing 2% sucrose to which 30 mM sodium fluoride were added.

Culture flasks were incubated at 28°C for 24 hours at the end of which the various media, together with the initials, were analysed for their direct and total reducing values.

From the results of the analysis of the various media, the amounts of sugar uptake and reducing sugars appearing in the medium were calculated and the average values are presented in Table 4. This Table

shows that sodium fluoride, at concentrations of 2 to 10 mM, induced some inhibition of sugar uptake and a considerable increase in the amount of reducing sugars appearing in the corresponding media. Higher concentrations of sodium fluoride inhibited both uptake and inversion of sucrose though the inhibition of uptake is greater than that of inversion.

Although these results strongly suggest that uptake from sucrose is dominantly uptake of reducing sugars, there remains the possibility that the residual uptake is an uptake of sucrose itself. If, however, this were the case the quantities of glucose and fructose released by inhibited mats should be nearly equal.

Table 5 shows that a discrepancy between glucose and fructose still exists when mats are inhibited.

Table 4. *Effect of Different Concentrations of Sodium Fluoride on the Uptake from and Inversion of Sucrose by Mycelial Mats of Rhiz. solani*

Concentration of NaF in the medium (mM)	Sugar uptake	Reducing sugars appearing in the medium
0 (Control)	340	355
2	300	474
10	276	510
20	240	330
30	180	330

The above conclusion is further substantiated by the results of an experiment in which mycelial mats were fed with culture media containing different concentrations of sucrose, namely, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 and 2% in presence or absence of 25 mM sodium fluoride. The culture media after being incubated in contact with the mycelial mats at 28°C for 24 hours were analysed, together with the corresponding initials, for their direct and total reducing values. From the results of the analysis of the various media the amounts of sugar taken up by the mycelial mats as well as the reducing sugars released in the various media are calculated and presented in Table 6.

The results in Table 6 show that when uptake of sugar from low concentrations is inhibited a rise in the quantity of reducing sugars results. This is not the case in the high sucrose concentrations, particularly 2%, where the decrease in the production of reducing sugars due to inhibition of inversion is quantitatively slightly more than the decrease in their absorption in the presence of fluoride.

The effect of the concentration of sucrose in the medium upon the absorption rate and upon the production of reducing sugars is represented graphically in Fig. 2 (p. 297).

Fig. 2 shows that there is no simple proportionality between sucrose uptake and total reducing sugars released in the medium nor is the quantity of reducing sugars released equal to the amount of sugar absorbed. Therefore a mechanism involving the splitting of sucrose at the

Table 5. *Analysis of Sucrose-Containing Media for their Sugar Contents after Coming in Contact with Mycelial Mats of Rhiz. solani in Presence of Various Concentrations of Sodium Fluoride*

(Expressed as mgms sugar per ml. medium)

Feeding medium	Sugar fraction	Concentration of sugar in the media after		
		(0) hours Initials	24 hours	48 hours
100 ml. B.M.* + 2 gm. sucrose	T.R.V. **	19.00	13.00	8.64
	D.R.V.	0.11	7.10	7.90
	Glucose	0.05	1.05	1.40
	Fructose	0.06	6.05	6.50
100 ml. B.M. + 2 gm. sucrose + 2 mM. NaF	T.R.V.	19.80	13.80	10.20
	D.R.V.	0.11	9.48	10.20
	Glucose	0.05	4.41	3.31
	Fructose	0.06	5.07	6.89
100 ml. B.M. + 2 gm. sucrose + 10 mM. NaF	T.R.V.	19.80	14.28	7.32
	D.R.V.	0.11	10.20	7.20
	Glucose	0.05	3.70	2.00
	Fructose	0.06	6.50	5.20
100 ml. B.M. + 2 gm. sucrose + 20 mM. NaF	T.R.V.	19.80	15.00	9.24
	D.R.V.	0.11	6.60	9.24
	Glucose	0.05	2.17	3.32
	Fructose	0.06	4.43	5.92
100 ml. B.M. + 2 gm. sucrose + 30 mM. NaF	T.R.V.	19.80	16.20	9.96
	D.R.V.	0.11	6.60	9.96
	Glucose	0.05	1.91	3.27
	Fructose	0.06	4.69	6.69

* B.M. = basal medium.

** T.R.V. = total reducing value; D.R.V. = direct reducing value.

Table 6. *Effect of 25 mM Sodium Fluoride on Uptake from and Inversion of Sucrose by Mycelial Mats of Rhiz. solani in Culture Media Containing Various Concentrations of Sucrose*

(Expressed as mgms sugar per mat)

Concentration of sucrose in the medium	Sugar uptake		Reducing sugars appearing in the medium	
	in absence of NaF	in presence of NaF	in absence of NaF	in presence of NaF
0.4%	184.5	93.0	7.5	61
0.8%	241.0	111.0	140.0	238.0
1.2%	275.5	144.0	310.0	230.0
1.6%	354.0	168.0	401.0	328.0
2.0%	370.0	165.0	521.0	300.0

cell surface, as part of the mechanism of uptake, so that one hexose moiety is absorbed and the other released is clearly inapplicable in simple form.

III. Discussion

From the foregoing discussion of the results it may be postulated that sucrose is utilised by mycelial mats of the test fungus through a process of hydrolytic cleavage into glucose and fructose effected by an enzyme of the fructofuranosidase type attached to the cytoplasmic surfaces rather than through the mediation of a specific sucrose phosphorylase.

Evidence supporting the above hypothesis may be marshalled as follows:

1. The production of reducing sugars in sucrose culture media when coming in contact with mycelial mats of *Rhiz. solani* is a process which is essentially independent of sugar uptake since these factors: heating at 75°C, silver nitrate, and sodium fluoride, which inhibit or diminish absorption, bring about an increased release of reducing sugars.

2. The presence of glucose or fructose in the sucrose-containing culture medium at a concentration of 2% as well as their presence in mixture in such media at a concentration of 2.5% each failed to induce any retarding effect on the utilisation of sucrose. Increasing the concentration of either sugar to 5% was accompanied by a marked reduction in the amounts of sucrose utilised.

If a specific sucrose phosphorylase is responsible for sucrose utilisation by the mycelial mats of the test fungus, one would have expected much greater reduction in the utilisation of sucrose in presence of glucose than fructose, the former being a strong competitive inhibitor of sucrose phosphorylase (DOUDOROFF 1945). Such effect was not revealed by the results of the present investigation.

3. When mycelial mats of the test fungus were suspended over culture media containing various concentrations of sucrose no simple proportionality was observed between sucrose uptake and total reducing sugars released in the media nor is the quantity of reducing sugars released equal to the amount of sugar absorbed. Therefore, a mechanism involving the splitting of sucrose at the cell surface, as part of the mechanism of uptake,

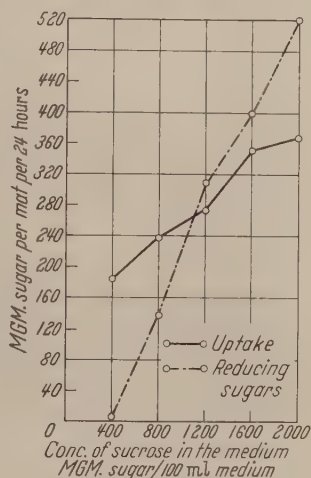


Fig. 2. Effect of concentration of sucrose in the culture medium upon the absorption rate and production of reducing sugars by mycelial mats of *Rhiz. solani*

so that one hexose moiety is absorbed and the other released, is clearly inapplicable in simple form.

Although the above results strongly suggest that uptake from sucrose is dominantly uptake of reducing sugars, there remains the possibility that the residual uptake is an uptake of sucrose itself. If, however, this were the case, the quantities of glucose and fructose released by mats inhibited with silver nitrate or sodium fluoride, should be nearly equal. The results recorded here showed that a discrepancy between the amounts of glucose and fructose released in the media still exists when mats are inhibited, thus refuting the possibility of uptake of the residual sucrose as such.

The results of the present investigation are in full agreement with those reached by SAÏD and his co-workers (1945, 1949, 1950, 1953) with regards to sucrose utilisation by higher plant tissues and mycelial mats of *Fusarium moniliforme*, and by TOLBA and GHANEM (1954, 1959) in case of some soft rot bacteria.

Summary

The results of the present investigation proved that sucrose is utilised by mycelial mats of *Rhizoctonia solani* through a process of hydrolytic cleavage into glucose and fructose affected by an enzyme of the fructo-furanosidase type attached to the cytoplasmic surfaces and not through the mediation of a specific sucrose phosphorylase enzyme.

References

- DOUDOROFF, M.: J. biol. Chem. **157**, 699 (1945).
 HARLEY, J. L., and D. C. SMITH: Ann. Bot. **20**, 513 (1956).
 MANDELS, G. R.: Amer. J. Bot. **38**, 213 (1951).
 MANDELS, G. R.: Plant Physiol. **29**, 18 (1954).
 NEUBERG, C., and I. MANDL: The enzymes: Chemistry and the mechanism of action by SUMNER, J. B. and MYRBÄCK, vol. I, part I, pp. 527. New York: Academic Press. Inc., Publishers 1950.
 RHEINHOLD, L.: Ph. D. Thesis, Cambridge, Univ. 1947.
 SAÏD, H.: Bull. Fac. Sci.; Fouad I Univ. **24**, 31 (1941); **25**, 117 (1945).
 Proc. 7th Intern. Bot. Cong., Stockholm, 754 (1950).
 SAÏD, H., and H. FAWZY: Proc. Egypt. Acad. Sci. **5**, I (1949).
 SAÏD, H., and K. NAGUIB: Bull. Fac. Sci. Cairo Univ. **32**, 83 (1953).
 STREET, H. E., and J. S. LOWE: Ann. Bot. **14**, 307 (1950).
 TOLBA, M. K., u. A. M. SALAMA: Physiol. Plant. **10**, 832 (1957).
 TOLBA, M. K., u. A. M. SALAMA: Arch. Mikrobiol. **36**, 23 (1960).
 TOLBA, M. K., u. S. S. GHANEM: Botan. Notiser **1954**, 154.
 TOLBA, M. K., u. S. S. GHANEM: Physiol. Plant. **12**, 910 (1959).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe

Über die Stoffausscheidung bei Pilzen II*

Die Ausscheidung sekundärer Stoffwechselprodukte

Von

EWALD SPRECHER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Oktober 1960)

Durch Farbe, Geruch oder Kristallbildung hat die Ausscheidung der sogenannten sekundären Stoffwechselprodukte (PAECH 1950) schon immer Aufmerksamkeit erregt. Es besteht darüber auch bei den Pilzen eine reiche Literatur, zu der in neuerer Zeit insbesondere die Antibiotica-Forschung sehr viel beigetragen hat (BRACKEN 1955, PRESCOTT u. DUNN 1959). Die Arbeiten beschäftigen sich allerdings zum weitaus größten Teil mit der Isolierung und Identifizierung der Verbindungen. Abgesehen von Produzenten wirtschaftlich verwertbarer Stoffe oder von einigen Standardorganismen wissenschaftlicher Laboratorien, sind die höheren Pilze jedoch relativ wenig systematisch auf ihre Ausscheidungstätigkeit hin untersucht.

Da im Gegensatz zu den bereits in einer früheren Arbeit (SPRECHER 1961) untersuchten primären Stoffen bei den sekundären der Stoffwechsel stärker variiert, werden im folgenden die beiden nahe verwandten Ascomyceten *Endoconidiophora virescens* Davids. (*End. vir.*) und *E. (Ceratocystis) coerulescens* (Münch) Bakshi (*Cer. coer.*) als Produzenten eines aliphatischen, den Terpenen verwandten Riechstoffes, von dem Basidiomyceten *Lentinus lepideus* L. (*Lent. lep.*) mit einem aromatischen Geruchstoff getrennt behandelt.

A. Material und Methodik

1. Verwendete Pilze und Kulturmethoden

Sie sind bereits in früheren Arbeiten angegeben (SPRECHER 1959, 1961). Abänderungen dieser Methoden für spezielle Zwecke oder zusätzliche Neueinführungen werden an den betreffenden Stellen kurz beschrieben.

2. Myceltrockengewichtsbestimmungen

Das mehrfach gewaschene Mycel wurde im Trockenschrank bei 60°C bis zu einer Gewichtskonstanz von ± 1 mg getrocknet.

3. Messung des pH -Wertes mittels Beckmann- pH -meter H_2

Die Nährlösungen wurden auf $pH\ 5,0 \pm 0,1$ eingestellt.

* Habilitationsschrift (gekürzt) der Fakultät für Natur- und Geisteswissenschaften, Technische Hochschule, Karlsruhe. Teil II.

4. Nachweis von *Eckretstoffen*

Der chromatographische Nachweis und die semiquantitative Auswertung der Chromatogramme primärer Stoffwechselprodukte erfolgte, wie bereits angegeben (SPRECHER 1959, 1961).

Das Methylheptenon konnte aus dem Wasserdampfdestillat und aus dem Ätherextrakt der Kulturen von *Endoconidiophora virescens* und *Endoconidiophora coeruleascens* isoliert werden. Zur Identifizierung dienten die Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte seiner Derivate (GUENTHER 1949), der gaschromatographische¹ Vergleich mit Methylheptenon (Fluka), die Dünnschichtchromatographie (STAHL 1958) und bei Routineuntersuchungen die Papierchromatographie nach den Methoden von SCHULTE u. STORP (1955) sowie von ZOCH (1958).

Der p-Methoxyzimtsäuremethylester (MZM) konnte aus dem getrockneten Mycel durch Tetrachlorkohlenstoff extrahiert werden. Der durch Mikrosublimation im Vacuum gereinigte Ester wurde nach dem Umkristallisieren durch Vergleich mit der synthetisch hergestellten Verbindung, durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Infrarotspektrum¹ identifiziert. Quantitative Angaben im Text beziehen sich auf den meist über 70% der reinen Substanz enthaltenden Tetrachlorkohlenstoffauszug (Rohextrakt) oder auf das nahezu reine Sublimat.

Der chromatographische Nachweis von fluorescierenden Substanzen, Zimtsäurederivaten und phenolischen Verbindungen wurde nach verschiedenen Methoden durchgeführt. Als Laufmittel dienten die Lösungsmittelgemische von HERZMANN (1958) und SHIMAZONO (1959), sowie verschiedene Modifikationen derselben, als Nachweisreagentien Ammoniak, FeCl_3 , diazotierte Sulfanilsäure (CRAMER 1958), 2,4-Dibromchinonchlorimid (HOFFMANN 1958) und die Fluoreszenz im ultravioletten Licht.

5. Untersuchungen mit *Hemmstoffen*

Die Hemmstoffe wurden vor der Beimpfung in den bereits früher (SPRECHER 1961) angegebenen Konzentrationen Normalnährlösungen zugesetzt.

6. Untersuchung der *Phenolasen-Aktivität*

Der qualitative Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Phenolasen erfolgte durch Zugabe verschiedener Reagentien. Als Enzymsubstrat wurden Guajacol, Guajacol + H_2O_2 , p-Cresol, Dopa, Tyrosin, Benzidin, p-Phenylendiamin, Hydrochinon, Phenol, α -Naphthol und Tyramin verwendet. Geprüft wurden Substrat, Myceleextrakt und gelegentlich dialysierte und teilweise gereinigte Enzymextrakte. Typische Farbstoffbildungen oder Niederschläge in gepufferten Lösungen mit verschiedenen pH -Werten galten als Kriterium (LINDBERG u. HOLM 1952; LYR 1957; YASUNOBU 1959; KREBS 1960).

Bei *Lent. lep.* wurde die Phenolase-Aktivität durch photometrische Messung der entstandenen Rotfärbung mit Hilfe des Elko III (Filter S 49 E) auch quantitativ verfolgt. Hierzu diente die Reaktion von Substrat oder Myceleextrakt mit p-Cresol, Guajacol und Guajacol + H_2O_2 in Citrat-Phosphat-Puffergemischen von pH 4,4, 5,6 und 6,8.

Das Reaktionsgemisch bestand aus 0,5 ml Myceleextrakt, 0,7 ml Puffer und 0,15 ml p-Cresol- oder Guajacollösung 1:60. Zur Herstellung des Myceleextraktes wurde das jeweilige Gesamtmycel von 50 ml Nährlösung in feuchtem gewaschenem Zustand mit insgesamt 10 ml Wasser verrieben, zentrifugiert und gegebenenfalls noch filtriert. Die Farbstoffbildung in dem Reaktionsansatz wurde laufend beobachtet. Nach 31 Std erfolgte die Zugabe von 5 ml Wasser und nach dem Filtrieren die photometrische Messung in Spezialreagensgläsern (Zeiss).

¹ Herrn Prof. Dr. R. CRIEGEE, dem Direktor d. Inst. f. Organische Chemie an d. Techn. Hochschule, Karlsruhe, an dessen Institut die Untersuchungen durchgeführt wurden, sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Bei der Messung der Enzymaktivität des Substrates wurde entsprechend verfahren, jedoch die doppelte Menge Substrat, Puffer- und Phenollösung verwendet.

7. Manometrische Messungen

Sowohl die Versuche zur Assimilation verschiedener C-Quellen, wie die Bestimmung der Polyphenolase-Aktivität wurden durch manometrische Messungen ergänzt. Die Atmungsmessungen erfolgten an Ruhezellen unter Zusatz von KH_2PO_4 . Zu 2,6 ml Mycelverreibung (siehe oben) wurde die betreffende C-Quelle bis zu einer Endkonzentration von 3% zugegeben. Zur Absorption des CO_2 dienten 0,2 ml KOH (10%).

Bei der Bestimmung der Polyphenolase-Aktivität wurden 2,6 ml Mycelextrakt (siehe oben) mit 0,3 ml p-Cresollösung (1:60) und 0,1 ml Puffer versetzt.

8. Antibioticateste

Die Pilze und ihre Stoffwechselprodukte wurden im Blättchen-, Zylinder-, Loch- und Verdünnungstest geprüft (KÖHLER 1956). Als Testorganismen dienten *Bacterium proteus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* und *Staphylococcus aureus*.

B. Ergebnisse

1. Methylheptenylketonbildung bei *Endoconidiophora virescens* und *Ceratocystis coerulescens*

a) Zeitpunkt und Lokalisierung der Methylheptenon-Bildung

Von den sekundären Stoffwechselprodukten der beiden nahe miteinander verwandten Ascomyceten fand BIRKINSHAW (1950) das 2-Methylhept-2-en-6-on, den entsprechenden Alkohol, sowie Isobutylacetat. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde besonders das Methylheptenylketon (MHK) und seine Biogenese verfolgt. Das Keton konnte isoliert und, wie im methodischen Teil angegeben, identifiziert werden.

Der routinemäßige Nachweis erfolgte chromatographisch aus dem Wasserdampfdestillat bzw. dem Ätherextrakt. Über Ort und Zeitpunkt der MHK-Bildung bei *Cer. coer.* und *End. vir.* ist in der Literatur nichts bekannt. Der Ketongeruch tritt in den Kulturen beider Pilze schon sehr früh auf und verschwindet dann wieder im Laufe der Autolyse.

Ein derartiger zeitlicher Ablauf liegt auch bei der Methylketonbildung durch verschiedene Pilze vor (FRANKE u. HEINEN 1958). Bei *Penicillium roqueforti* hatten nun GEHRIG u. KNIGHT (1958) festgestellt, daß 2-Heptanon von den Sporen und nicht vom Mycel des Pilzes gebildet wird. Obwohl sich das Endprodukt von *Cer. coer.* und *End. vir.* von dieser Verbindung durch Verzweigung seiner C-Kette und durch eine Doppelbindung unterscheidet, lag es nahe zu untersuchen, ob und inwieweit auch hier die Sporen das MHK bilden.

Die oft sehr ungleichmäßigen Conidien entstehen endogen aus kräftigen braunen Hyphen. Dabei können über 50 Sporen aus einem relativ kurzen Hyphenstück austreten. Neben den derbwandigen braunen Hyphen, aus denen die sporogenen Hyphen hervorgehen, enthält das Mycel noch dünne, durchsichtige Hyphen. Ihr Anteil am Gesamtmycel variiert je nach Alter und Kulturbedingungen.

Sporenfrees, farbloses Submersmycel aus dünnen, durchsichtigen Hyphen weist bei *End. vir.* ebensowenig wie das umgebende Substrat MHK-Geruch auf, bei sporenbildendem Oberflächenmycel ist dies jedoch der Fall.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung oder nach Beimpfung mit kräftigem, frischem Mycel tritt auch an Submershyphen und im Substrat der Ketongeruch auf, das MHK kann dann aus Mycel und Substrat isoliert werden. Mit Sudan III färben sich die frischen Sporen relativ

Tabelle 1. *Einfluß von Impfstück und Entwicklung auf die Biogenese des MHK in Schüttelkulturen von Cer. coer.*
(Kulturalter 10 Tage)

Herkunft des Impfstücks	Vom ursprünglichen Impfstück einer 9 Tage alten Malzagarkultur mit sehr vielen Conidien				Vom Neuzuwachs einer 12 Tage alten Malzagarkultur mit mäßig vielen Conidien			
pH im Substrat	4,7	4,8	7,9	8,2	5,0	5,8	6,7	7,9
Myceltrockengewicht in Milligramm	70	488	396	235	170	267	342	150
Restglucose im Substrat in Prozent	65	—	—	—	45	15	—	—
Anteil der braunen Hyphen	mäßig	gering	mäßig	—	stark	stark	stark	stark
Endoconidien in der Kultur	wenige	wenige	wenige	ganz vereinzelt	viele	viele	viele	sehr viele
Geruch der Kultur	gering nach Sellerie	nach Most	Spur muffig	muffig	gering nach Sellerie	kräftig MHK	kräftig MHK	MHK

kräftig, die braunen Hyphen etwas schwächer, und die dünnen, durchsichtigen Hyphen gar nicht.

In weiteren Versuchen wurden Wachstum, Sporenbildung und MHK-Synthese durch laufende mikroskopische Beobachtung, geruchliche Überprüfung und chemische Untersuchung verfolgt. Dabei erwies sich das Oberflächenmycel als bevorzugter Ort der Sporen- und MHK-Bildung.

Demgegenüber zeigte sich bei dem erzwungenen Submerswachstum von Schüttelkulturen (Tab.1), daß dies nicht unter allen Bedingungen zutrifft. Hier fallen besonders die Beziehungen zwischen der Entwicklung kräftiger, brauner Hyphen und Endoconidien einerseits und der Synthese des MHK andererseits auf.

Aufschlußreich ist auch das Alter des Impfmaterials. Trotz der Herkunft aus der gleichen Vorkultur ist die Entwicklung eine völlig verschiedene, je nachdem ob Mycel vom alten Impfstück oder vom neuen Zuwachs entnommen wurde. Offensichtlich ist das aus dem ehemaligen Impfstück und dessen Sporen entstammende Mycel physiologisch, morphologisch und biochemisch deutlich von dem „normalen“

Typ verschieden. Besonders auffällig dabei ist, daß das nahezu geruchlose Mycel das höchste Trockengewicht aufweist. Inwieweit hier möglicherweise der „shunt metabolism“ (MHK-Bildung) umgangen wird, muß zunächst noch dahingestellt bleiben.

Das Ergebnis bestätigt jedenfalls, daß auch die Submershyphen die Fähigkeit besitzen, MHK und Sporen zu bilden. Diese kommt, wie bereits erwähnt, bestimmten Hyphen zu, die sowohl in Oberflächen- als auch in Submersmycel auftreten können.

Zur Ausschaltung des bei Schüttelkulturen wirksamen Belüftungseffekts wurden einige Versuche mit Oberflächenkulturen in Stickstoffatmosphäre durchgeführt (Tab.2). Die Gegenüberstellung zeigt, daß in

Tabelle 2. *Der Einfluß von Normal- und N₂-Atmosphäre auf Wachstum und MHK-Bildung bei Cer. coer. auf Normalnährlösung (bei 28°C)*

	12 Tage Normalkultur			7 Tage Normalkultur, dann 5 Tage N ₂ -Atmosphäre		
p _H im Substrat	6,3	6,8	7,7	5,7	6,1	7,7
Restglucose im Substrat in Prozent	20	Spur	—	20	15	—
Myceltrockengewicht in Milligramm	265	276	165	239	290	222
Geruch der Kultur	stark nach MHK	stark nach MHK	muffig	etwas vergoren	etwas nach MHK	nach MHK

N₂-Atmosphäre die MHK-Synthese zurückgeht. Dies kommt vor allem dort zum Ausdruck, wo das Wachstum vor dem Einbringen in die N₂-Atmosphäre relativ gering war. Trotz weiterem Zuckerverbrauch scheint die Bildung von MHK reduziert zu werden. Kulturen, die vom Zeitpunkt der Beimpfung an unter der niederen Sauerstoffspannung des N₂-Durchstroms aus der Bombe stehen, haben ebenfalls keinen MHK-Geruch, sondern etwa den einer leichten Gärung. Die mikroskopische Analyse erweist aber das Vorhandensein der braunen, derbwandigen Hyphen, die normalerweise das MHK bilden. Doch traten unter diesen Bedingungen auch nach monatelanger Beobachtung weder Endoconidien noch der MHK-Geruch auf.

Aus diesen und entsprechenden Befunden an *End. vir.* läßt sich der Schluß ziehen, daß die beiden Ascomyceten unter einer sehr niederen Sauerstoffspannung zwar noch wachsen können, zur Entwicklung von Endoconidien und MHK jedoch eine Mindestmenge O₂ benötigen. Hier liegt auch die Erklärung, weshalb Sporen- und Duftstoffproduktion in Submerskultur nur sehr verzögert vor sich gehen, unter den Bedingungen der Schüttelkultur jedoch stark gefördert werden.

Diese Ergebnisse erlauben nunmehr den Schluß, daß bei den untersuchten Organismen die Bildung von Endoconidien und MHK miteinander gekoppelt sind. Sie stehen jedoch im Gegensatz zu der Hypothese v. GUTTENBERGS (1951), nach der die Biosynthese der ätherischen Öle mit einer Verknappung von O_2 im Gewebe zusammenhängt. Weder völliger O_2 -Ausschluß, noch eine O_2 -Spannung, die ein langsames Wachstum erlaubt, fördern die Bildung des Hauptriechstoffes von *End. vir.* und *Cer. coer.* Ebenso wenig entsprechen die Ergebnisse hemmungsanalytischer Untersuchungen der Biogenese ätherischen Öls bei höheren Pflanzen (BURMEISTER 1958) den eigenen Befunden an den beiden Ascomyceten.

Über das weitere Schicksal des von beiden Pilzen ausgeschiedenen MHK läßt sich zunächst noch nichts sagen. Vorläufige chromatographische Untersuchungen deuten darauf hin, daß auch während der Autolyse, obwohl der Geruch nach MHK bereits völlig verschwunden ist, noch ein Teil dieses Ketons vorliegt, mindestens aber unter den Bedingungen der Wasserdampfdestillation freigesetzt werden kann. Ein anderer Teil scheint in derselben Weise verändert zu werden, wie dies auch bei längerem Aufbewahren von reinem MHK der Fall ist. Inwieweit Umwandlungen des MHK durch Pilzenzyme eintreten, muß zunächst noch offenbleiben.

b) Veränderung der MHK-Synthese durch Variation des Mediums

Entsprechend den Untersuchungen über die Ausscheidung der primären Stoffwechselprodukte (SPRECHER 1961a) soll nunmehr versucht werden, Synthese und Ausscheidung des MHK sowie anderer wasserdampf-flüchtiger Stoffe bei *Cer. coer.* und *End. vir.* zu beeinflussen. Da letztere weitgehend Duftstoffe sind, werden sie nachfolgend in Anlehnung an die Definition bei höheren Pflanzen (SPRECHER 1958) als ätherisches Öl bezeichnet.

1. Veränderungen des Substrates, die das C:N-Verhältnis betreffen, ließen auf Grund der Untersuchungsergebnisse des primären Stoffwechsels (SPRECHER 1961) auch eine Beeinflussung der Synthese sekundärer Stoffe erwarten (Tab. 3).

Beide Tabellen zeigen, daß bei einer relativ hohen Glucosekonzentration, bei der der Kohlenstoff niemals zum begrenzenden Faktor wird, die Ausbeute an wasserdampf-flüchtigen Stoffen mit Erhöhung der N-Konzentration ansteigt. Die besonders hohen Werte bei den älteren Kulturen sind allerdings Anzeichen einer beginnenden Autolyse, was auch die Analyse der ausgeschiedenen Primärprodukte erweist. Die Ketonproduktion wird durch Veränderungen des N-Gehaltes in der Nährlösung nur geringfügig beeinflußt.

Darüber hinaus lassen die Tabellen erkennen, daß in Übereinstimmung mit früheren Befunden (SPRECHER 1961) und nachfolgenden Untersuchungen der Stickstoff außerordentlich gut verwertet wird. Er ist bei *End. vir.* in den verwendeten Konzentrationen nie Minimumfaktor. Mit

Tabelle 3. *Gehalt an ätherischem Öl bei End. vir. auf Normalnährlösung mit 3% Glucose und verschiedenen Mengen NH₄NO₃*

Gramm NH ₄ NO ₃ in 100 ml Substrat	0,05	0,18	0,48	0,72
a) relativ junge Kulturen				
pH im Substrat*	2,7	2,6	2,6	2,7
Myceltrockengewicht in Milligramm je Kultur*	39	50	30	20
Geruch der Kultur	kräftig nach MHK	etwas nach MHK	nicht typisch	nicht typisch
Gehalt an ätherischem Öl, bezogen auf Trockengewicht in Prozent	1,5	1,1	2,5	2,8
Ketongehalt im äther. Öl in Prozent	etwa 50	etwa 50	etwa 25	etwa 20

b) relativ alte Kulturen

pH im Substrat*	4,1	2,3	2,2	2,2
Myceltrockengewicht in Milligramm je Kultur*	460	250	235	230
Geruch der Kultur	—	—	—	—
Gehalt an ätherischem Öl, bezogen auf Trockengewicht in Prozent	0,3	1,0	10,0	10,0
Ketongehalt im äther. Öl in Prozent	etwa 50	etwa 50	etwa 5	etwa 5

* Durchschnitt von 29 Kulturen zu je 50 ml Nährlösung.

Tabelle 4. *Gehalt an ätherischem Öl bei End. vir. auf Normalnährlösung mit 3% Glucose und verschiedenen Asparaginemengen*

Gramm Asparagin in 100 ml Substrat	0,05	0,3	0,72
pH im Substrat*	4,1	4,1	4,4
Myceltrockengewicht in Milligramm *	158	176	193
Restglucose im Substrat in Prozent	30	25	20
Geruch der Kultur	stark nach MHK		
Gehalt an äther. Öl, bezogen auf Trockengewicht in Prozent	0,44	1,25	1,6
Ketongehalt im äther. Öl in Prozent	etwa 60	etwa 30	etwa 40

* Durchschnitt von 29 Kulturen zu je 50 ml Nährlösung.

NH₄NO₃ als N-Quelle wirkte der einseitige Verbrauch des Ammoniumions und das damit verbundene Absinken des pH-Wertes allerdings wachstumsbegrenzend.

2. Bei Ersatz des Ammoniumnitrates durch Asparagin war eine Änderung dieser Verhältnisse zu erwarten (Tab.4). Auch hier ist

eine, wenn auch wesentlich geringere Zunahme des ätherischen Öls mit der Erhöhung der N-Konzentration verbunden, nur nimmt dabei der Ketonanteil nicht so deutlich ab wie in der Versuchsreihe mit NH_4NO_3 (siehe Tab.3).

Diese Befunde treffen bei *Cer. coer.* jedoch nicht zu (Tab.5).

Die Erklärung für einen derartig auffälligen Unterschied liegt in der verschiedenen Ausnutzung der C-Quelle für das Wachstum: *Cer. coer.* braucht gegenüber *End. vir.* für ein bestimmtes Mycelgewicht mehr Zucker (SPRECHER 1961a). In der Tat läßt sich bei der Analyse der primären Produkte in den Kulturen mit 0,05 % Asparagin in der Nährlösung

Tabelle 5. Gehalt an ätherischem Öl bei *Cer. coer.* auf Normalnährlösung mit 3% Glucose und verschiedenen Asparaginnengen

Gramm Asparagin in 100 ml Substrat	0,05	0,3	0,72
pH im Substrat*	4,0	6,6	6,7
Myceltrockengewicht in Milligramm *	147	233	314
Geruch der Kultur	sehr stark nach MHK		
Gehalt an äther. Öl, bezogen auf Trockengewicht in Prozent	5,15	1,0	1,15
Ketongehalt im äther. Öl in Prozent	etwa 50	etwa 50	etwa 40

* Durchschnitt von 29 Kulturen zu je 50 ml Nährlösung.

neben etwa 30 % der ursprünglichen Glucosemengen nunmehr kein Asparagin mehr nachweisen. Damit wird deutlich, daß unter den gegebenen Bedingungen der durch C-Überschuß hervorgerufene „overflow metabolism“ (FOSTER 1949) das meiste ätherische Öl und die höchste MHK-Ausbeute erbringt. Dem C-Gerüst des Asparagins kommt bei der Entstehung des Ketons keine wesentliche Bedeutung zu. Es wird vielmehr im allgemeinen Stoffwechsel mit umgesetzt.

Bei der Reduktion der Glucosemenge im Substrat auf 1 % treten diese Bedingungen schließlich auch bei *End. vir.* ein (Tab.6). Daraus ergibt sich eindeutig, daß der Überschuß von C gegenüber N zu einem Anstau von bestimmten Verbindungen führt, die für die Entstehung sekundärer Stoffwechselprodukte wesentlich sind.

3. Ersetzt man Glucose im Nährmedium durch Äthanol, Glycerin oder Säuren des Krebscyclus, so bilden *Cer. coer.* und *End. vir.* auf Äthanol, Bernsteinsäure und Apfelsäure etwa dasselbe Mycelgewicht und nahezu die gleiche MHK-Menge wie auf Glucose. Auf Glycerin, Citronensäure und Cellulose entspricht die Bildung des ätherischen Öles und des Ketons dem schlechteren Wachstum.

An weiteren C-Quellen wurden ferner solche Fettsäuren verwendet, die sich auch im ätherischen Öl nachweisen ließen (Palmitin-, Öl-, Stearin-, Myristicin- und Laurinsäure). Diese werden allein von den beiden Pilzen

schlecht verwertet; nach Ausbildung einer schwachen Myceldecke kommt es zum Wachstumsstillstand. Wird gleichzeitig etwas Glucose zugefügt, können sie etwas besser assimiliert werden, doch ist die MHK-Produktion in jedem Fall unerheblich.

4. Bei Verabreichung verschiedener Aminosäuren als N-Quelle besteht die Möglichkeit des Einbaues ihrer C-Gerüste als „precursor“ in bestimmte sekundäre Stoffe. Während jedoch die Grund-

Tabelle 6. Gehalt an ätherischem Öl bei *End. vir.* auf Normalnährlösung mit 1% Glucose und verschiedenen Asparaginnengen

Gramm Asparagin in 100 ml Substrat	0,05	0,18	0,48	0,72
pH im Substrat*	3,5	6,5	8,4	8,1
Myceltrockengewicht in Milligramm*	173	195	203	190
Restglucose im Substrat in Prozent	15	15	Spur	10
Geruch der Kultur	—	—	—	—
Gehalt an ätherischem Öl, bezogen auf Trockengewicht in Prozent	0,25	0,09	0,07	0,06
Ketongehalt im äther. Öl in Prozent	etwa 60	etwa 50	etwa 30	etwa 20

* Durchschnitt von 29 Kulturen zu je 50 ml Nährlösung.

Tabelle 7. Gehalt an ätherischem Öl bei *End. vir.* auf Normalnährlösung mit verschiedenen N-Quellen

N-Quelle	Asparagin	Glutaminsäure	Glycin	Alanin	Valin	Leucin
pH im Substrat*	5,0	5,5	4,6	5,0	3,9	4,1
Myceltrockengewicht in Milligramm*	242	308	362	363	130	79
Restglucose im Substrat in Prozent	20	15	10	10	5	5
Gehalt an ätherischem Öl, bezogen auf Trockengewicht in Prozent	0,66	0,48	0,62	0,73	0,78	10,7
Geruch der Kultur	MHK	MHK	stark MHK	stark MHK	MHK+ an-gegoren	an-gegoren
Ketongehalt im ätherischen Öl in Prozent	etwa 50	etwa 50	etwa 60	etwa 60	etwa 15	etwa 25

* Durchschnitt von 29 Kulturen zu je 50 ml Nährlösung.

aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin und Glycin etwa zur gleichen Ausbeute an ätherischem Öl und MHK wie bei Asparagin führten, war das Kulturverhalten auf Valin und besonders auf Leucin völlig andersartig (Tab. 7). Das Ergebnis mit Valin entspricht in gewissem Sinne dem mit Ammoniumnitrat. Obwohl aber mit Leucin überraschend viel ätherisches Öl gebildet wird, ist die Ketonproduktion

sowohl bei Valin als auch bei Leucin auffallend gering. Dagegen treten hierbei bevorzugt wasserdampfflüchtige Säuren, insbesondere Buttersäure oder Isobuttersäure im ätherischen Öl auf.

Entgegen den Erwartungen erwiesen sich die sieben verwendeten Inhibitoren mit ihren verschiedenen Angriffspunkten auf den Stoffwechsel bei der angewendeten Methode ohne erheblichen Einfluß auf die Synthese des ätherischen Öls und des Ketons. Die Bildung dieser sekundären Stoffwechselprodukte wurde, ähnlich wie die der primären (SPRECHER 1961a) mehr durch das jeweilige Wachstum als durch den Hemmstoff direkt beeinflußt. Lediglich KCN fördert die Bildung von MHK, wobei jedoch der Wirkungsmechanismus zunächst unklar bleibt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit verschiedenen C- und N-Quellen legen es nahe, das Auftreten bestimmter primärer und sekundärer Stoffwechselprodukte zu vergleichen. Das Vorkommen der Isobuttersäure neben dem MHK, die Rolle von Valin und Leucin bei der Bildung dieser Verbindungen und schließlich die deutlichen Beziehungen zwischen Valin und Leucin selbst, weisen auf die Möglichkeit einer Kopplung der Synthesewege dieser vier Verbindungen hin.

Die strukturelle Verwandtschaft des MHK zu den Terpenen läßt es darüber hinaus möglich erscheinen, daß in dem ätherischen Öl der beiden Ascomyceten auch Verbindungen dieser Körperklasse vorliegen. Untersuchungen darüber sind im Gange.

2. Die Bildung von *p*-Methoxyzimtsäuremethylester und das Auftreten eines braunen Farbstoffes bei *Lentinus lepideus*

Bei *Lent. lep.* treten in festen und flüssigen Substraten und auf der Myceldecke neben einem typischen, leicht an Zimt erinnernden Geruch gelegentlich Kristallnadeln auf, die von BIRKINSHAW (1940) als *p*-Methoxyzimtsäuremethylester (MZM) erkannt wurden. Diese Verbindung konnte auch aus den Kulturen des verwendeten Stammes isoliert und durch Vergleich mit der synthetisierten Verbindung eindeutig identifiziert werden (siehe method. Teil). Bei den nachfolgend geschilderten Untersuchungen über Biogenese und Ausscheidung dieses Zimtsäurederivates wurde die Kristallbildung unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. In den meisten Fällen konnten die Befunde durch gravimetrische Bestimmungen des MZM-Gehaltes der Kulturen gesichert werden. Daneben wurden Farbstoffbildung in Mycel und Substrat, Ausscheidung von methylierten und nicht methylierten phenolischen Verbindungen sowie die Tätigkeit der Polyphenoloxidasen untersucht.

Das Auftreten der MZM-Kristalle bei *Lent. lep.* ist bereits in einigen Arbeiten der NORDSchen Schule erwähnt und seine Biogenese in Zusammenhang mit der Ligninsynthese untersucht worden (SHIMAZONO 1959). Diese Befunde werden durch die eigenen Ergebnisse vielfach bestätigt und ergänzt. Ein Teil der eigenen Arbeiten lief zeitlich parallel, jedoch unabhängig von denen der amerikanischen Autoren.

Auftreten und Verschwinden der MZM-Kristalle und MZM-Ausbeute werden in Tab. 8 mit dem Wachstum des Pilzes und der Farbstoffbildung in Mycel und Substrat verglichen. Die Übersicht macht deutlich, daß im Laufe der Kultur die Färbung immer intensiver wird. Tatsächlich konnte bei keiner Versuchsanstellung die Bildung des braunen Farbstoffes völlig aufgehoben oder rückgängig gemacht werden. Demgegenüber besitzt die MZM-Produktion ein ausgesprochenes Maximum, das mit der Zeit intensivsten Wachstums zusammenfällt. Farbstoff- und MZM-Synthese erfolgen oft gleichzeitig, doch ist die MZM-Bildung mehr Ausdruck eines jugendlichen, kräftigen Wachstums, während die Farbstoff-

Tabelle 8
Das Auftreten der sekundären Produkte bei *Lent. lep.* auf 50 ml Normalnährlösung
(Kulturalter 45—87 Tage)

pH im Substrat	3,8	4,1	4,2	4,3	4,4	4,9	5,6	6,2
Myceltrockengewicht in Milligramm	82	117	314	320	485	361	274	220
Farbe des Mycels	weiß- lich	etwas braun- fleckig	braunfleckig		bräun- lich- braun		braun verkrustet	
Farbe des Substrates	Spur gelb- lich	hell- gelb	gelb	braun	dunkelbraun		schwarz- braun	
Geruch der Kultur	zunehmend nach Zimt				abnehmend			
Kristalle im Substrat	keine Kristalle		viele - kleine - Kristalle				keine Kristalle	
mg MZM-Rohextrakt je Kultur	1,5				2,1		1,3	0,67
Glucose im Substrat	abnehmend				—	—	—	—
Sedoheptulose im Mycel	zunehmend						—	

synthese mehr den physiologisch älteren Zustand repräsentiert. So hebt sich auch fast immer das Impfstück durch seinen tieferen Farbton vom Neuzuwachs ab, selbst wenn es im Moment der Impfung weißes, jugendliches Mycel war.

In schnell wachsenden Kulturen scheiden die jugendlichen Hyphen bei günstigen Bedingungen soviel MZM aus, daß davon zunächst meist ein gewisser Teil unverändert in Kristallform liegen bleibt, während bei langsamerem Wachstum die Kristallnadeln entweder gar nicht ausgebildet werden oder rasch wieder verschwinden, während gleichzeitig Mycel und Substratfärbung sich vertiefen. Die Kristallbildung schließt also das Auftreten des Farbstoffes nicht aus, sondern verzögert es höchstens.

Von den Faktoren, die den Schwerpunkt der Biogenese eventuell in die eine oder andere Richtung verschieben können, wurde zunächst der Einfluß des Lichts und der Temperatur untersucht (Tab. 9). Daraus scheint

Tabelle 9. Kristall- und Farbstoffbildung verschieden beimpfter Kulturen von *Lent. lep.* auf Normalnährlösung in Abhängigkeit von Licht und Temperatur

	a) dunkel bei 20°C aufbewahrt									
	4,4	4,6	4,8	4,4	4,5	4,4	4,3	4,1	4,2	4,1
pH im Substrat	56	56	62	64	72	74	93	146	153	270
Myceltrockengewicht in Milligramm	4	4,5	3,5	4	4	4	4	5	5	5
MZM-Kristalle* im Substrat		gelb	gelblich			gelb		braun		dunkelbraun
Substratfarbe										
	b) in diffusum Licht bei 19°C aufbewahrt									
	4,4	4,5	4,1	4,5	3,9	4,1	3,8	4,3	3,8	
pH im Substrat	50	61	66	69	72	79	90	102	111	
Myceltrockengewicht in Milligramm	—	—	—	—	—	—	—	2	5	
MZM-Kristalle* im Substrat		gelblich	hell-	gelblich	hell-	hellbraun		rotbraun		
Substratfarbe			braun				hell-			

* — = keine, 1 = sehr wenige, 7 = sehr viele Kristalle.

hervorzugehen, daß das Licht die MZM-Synthese besonders stark hemmt, da in den Hellkulturen nur die beiden aus Impfstücken mit jungem Mycel rasch auswachsenden Kulturen Kristalle bildeten.

Eine Nachprüfung dieser Befunde an Kulturen, die entweder nur aus jungem, weißem oder aus altem, braunem Impfmateriel hervorgingen, ergab, daß die offensichtlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen in Tab. 9a und 9b vor allem durch die etwas höhere Temperatur in den Dunkelkulturen bewirkt wurde. Es zeigte sich, daß der Einfluß der Belichtung auf jüngere Hyphen unerheblich ist, daß dagegen bereits die Temperaturerhöhung um 1°C in diesem Stadium eine deutliche Wachstumsbeschleunigung, verbunden mit verstärkter MZM-Kristallbildung, hervorruft. Dagegen wirkt das Licht auf älteres Mycel stark hemmend und zwar gleichgültig, ob sich dieses in verbrauchtem Substrat oder in einem frischen Ansatz befindet. Die Reduktion des Wachstums bewirkt gleichzeitig eine Hemmung bzw. Sistierung der MZM-Bildung sowie eine weitere Farbvertiefung.

Ein Einfluß der Temperatur zeigt sich auch bei +4°C. Das Wachstum ist hier stark reduziert, trotzdem kommt es zu einer teilweise nicht unbeträchtlichen Vermehrung der Kristalle, die später wieder aufgelöst werden, was jedoch ebenso wie die

Farbstoffbildung nur äußerst langsam erfolgt. Augenscheinlich wird durch niedrigere Temperaturen die Farbstoffsynthese stärker gehemmt als die Kristallbildung.

1. Veränderungen des C:N-Verhältnisses der Nährlösungen weisen, ähnlich wie bei *Cer. coer.* und *End. vir.* bei Zuckerüberschuß (3% Glucose) keine direkten Beziehungen zu der Genese des MZM auf. Die Bildung von MZM ist hierbei meist in den niederen Konzentrationen am stärksten, doch lassen sich diese Befunde nicht exakt reproduzieren.

Tabelle 10. *Ausbeute an MZM bei Lent. lep. auf Normalmedium mit 1% Glucose und wechselnden Mengen Ammoniumnitrat bzw. Asparagin*

N-Gabe in %	pH im Substrat von jeweils 29 Kulturen	Durchschnitts- myceltrocken- gewicht in mg	Zahl der kristall- haltigen Kulturen	MZM-Gehalt in % bzw. auf Mycel- trockengewicht Rohextrakt
NH ₄ NO ₃ 0,05	2,9—4,0	60	—	1,1
0,18	2,9—3,9	53	3	1,5
Asparagin 0,05	4	56	—	1,1
0,18	3,9—6,0	60	4	1,5
0,48	4,2	67	—	0,96
0,72	4,6	56	—	0,94

Demgegenüber sind die Ergebnisse der Kulturreihen mit geringerem C-Gehalt (1% Glucose) eindeutig und entsprechen der bereits durch die Untersuchungen an *Cer. coer.* und *End. vir.* bestätigten Vorstellung über die Entstehung sekundärer Produkte im Rahmen eines „overflow metabolism“ (Tab. 10). Daraus geht hervor, daß das meiste MZM nicht bei dem größten Überschuß an Glucose entsteht, sondern bei einem ganz bestimmten C:N-Verhältnis. Da die Mycelgewichte keinen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Plasmasynthese und MZM-Produktion erkennen lassen, dürfte sich das Optimum für die MZM-Synthese bei dem C:N-Verhältnis einstellen, das einerseits genügend C-Überschuß für den „overflow metabolism“, andererseits noch genügend N für die erforderlichen Enzymsynthesen bietet.

2. Ersetzt man die Glucose durch andere C-Quellen, so erweist sich, im Gegensatz zu den beiden Ascomyceten, Glycerin als besser verwertbar, während Äthanol und ebenso die Krebscyclus-Zwischenprodukte relativ schlecht assimiliert werden. Die Bildung von MZM ist in Kulturen mit Glycerin entsprechend dem Wachstum bei weitem am stärksten, glucosehaltige Kulturen folgen. Die anderen verwendeten C-Quellen, einschließlich Cellulose, führen bei gleichzeitig schwachem bis mäßigem Wachstum nur zu einer sehr geringen Ausbeute an MZM. Dies trifft auch für Inosit zu, obwohl diese Verbindung (PACHE 1950) als hypothetischer Grundkörper aromatischer Pflanzenstoffe genannt wird.

3. Der Ersatz von Asparagin durch andere Aminosäuren wirkt sich hinsichtlich der Bildung von MZM dann am deutlichsten aus, wenn im Substrat relativ niedere Zuckerkonzentrationen (1% Glucose) vorliegen (Tab.11). Aus dieser Tabelle ergeben sich bemerkenswerte

Tabelle 11. *Mycelgewicht, Kristall- und Farbstoffbildung von Lent. lep. in Normalnährlösung mit 1% Glucose und verschiedenen N-Quellen*

N-Quelle	Konzentrat in %	Wüchsig- keit	Maximales Myceltrocken- gewicht je 50 cm ³ Nährlösung in mg	Kristall- bildung* von MZM	MZM- Roh- extrakt % i. Tr.	Substrat- farbe
1. Pepton	0,15	sehr rasch	124	7,5	5,2	braun
2. Leucin	0,4	rasch	115	6	3,6	braun
3. Asparaginsäure + Tyrosin	0,5 0,1	rasch	96	—		schwarz- braun
4. NH ₄ NO ₃	0,2	rasch	91	6	3,6	braun
5. Asparaginsäure + Tyrosin	0,3 0,05	rasch	88	—		schwarz- braun
6. Leucin	0,6	rasch	86	7	5,2	hellbraun
7. Alanin	0,4	mäßig	84	3	1,7	dunkelbraun
8. Asparagin	0,2	rasch	75	7	6,8	dunkelbraun
9. Asparagin	0,4	rasch	73	4,5	3,4	dunkelbraun
10. Glycin	0,4	mäßig	68	—		dunkelbraun
11. Glutaminsäure	0,6	mäßig	65	5	3,6	dunkelbraun
12. Asparaginsäure + Alanin	0,2 0,2	rasch	61	3,5	1,5	dunkelbraun
13. Valin	0,6	langsam	59	—		dunkelbraun
14. Asparaginsäure + p-Aminobenzoe- säure	0,3 0,05	mäßig	58	—		dunkelbraun
15. Glutaminsäure	0,4	mäßig	57	2,5		dunkelbraun
16. Valin	0,4	langsam	56	—		dunkelbraun
17. Glycin	0,6	mäßig	51	0,5		dunkelbraun
18. Asparaginsäure	0,4	sehr	48	1		dunkelbraun
19. Asparaginsäure	0,6	langsam	48	1		dunkelbraun
20. Tryptophan	0,4	sehr langsam	48	—		braun

* — = keine, 1 = sehr wenige, 7 = sehr viele Kristalle.

Beziehungen zwischen erreichbarem Mycelgewicht und MZM-Bildung. Abgesehen von Tyrosin und Phenylalanin, die in einen Farbstoff eingehen und nicht zur MZM-Synthese verwendet werden, zeigt es sich, daß die Bildung des Zimtsäurederivates unter relativ geringem Energie- und Baustoffverbrauch neben der Synthese des Zellmaterials erfolgt. Demgegenüber erfordert die Assimilation des Stickstoffs einiger Aminosäuren anscheinend zum Teil sehr viel Glucose, die dann bei der Mycelbildung

fehlt. Auffällig ist dabei, daß Mischungen von zwei oder drei Aminosäuren auch dann „glucosesparend“ wirken, wenn die Einzelbestandteile dieser Mischungen für sich allein schlecht verwertet werden.

Die Tatsache, daß aus Tyrosin und Phenylalanin als möglichen Grundkörpern der MZM-Synthese fast ausschließlich Farbstoff gebildet wird, kann als weiteres Zeichen für eine gewisse Konkurrenz dieser beiden Prozesse um Vorstufen gewertet werden.

Erhöht man unter Beibehaltung der verschiedenen Aminosäuren die Menge der Glucose von 1% auf 3%, so wird zwar mehr Zellmaterial gebildet, die Produktion von MZM bleibt aber im wesentlichen die gleiche. Wie schon bei der Synthese des MHK, erweist sich auch hier nicht die Kohlenhydrat-Akkumulation an sich, sondern der Stoffumsatz als wesentlich für die Entstehung sekundärer Produkte.

Völlig aus dem Rahmen fallen jedoch bei diesen Untersuchungen die Kulturen mit Leucin und Valin. Mit Leucin als einziger N-Quelle entsteht aus 3% Glucose die doppelte Menge MZM wie aus 1% Glucose, nämlich 11,2% „Rohextrakt“ oder 9,9% reines MZM. Valin und 3% Glucose führen sogar zu einer Ausbeute an MZM, die ein Mehrfaches der mit 1% des Zuckers gebildeten Menge beträgt. Möglicherweise eignet sich das C-Gerüst dieser Aminosäuren besonders gut zum Aufbau dieses sekundären Stoffwechselproduktes. Doch muß auch an eine Umstimmung des Stoffwechsels durch ein Überangebot bestimmter, von Valin und Leucin ableitbarer Verbindungen gedacht werden.

4. Die Wirkungen von Inhibitoren auf das Wachstum von *Lent. lep.* wurden bereits früher (SPRECHER 1961) aufgezeigt. Ihr Einfluß auf die Bildung von MZM scheint weitgehend indirekt zu sein, doch entspricht er nicht völlig demjenigen, den sie auf die Produktion des ätherischen Öls bei *Cer. coer.* und *End. vir.* ausüben. Zwar wirkt KCN auch bei *Lent. lep.* selbst in höheren Konzentrationen (0,013%) in der Regel fördernd auf die MZM-Bildung, dagegen hemmt As_2O_3 , das die MHK-Synthese noch positiv beeinflusst, die Produktion des Zimtsäurederivates. Auch bei As_2O_5 -Zusatz ist zwar ein kräftiges Mycelwachstum, aber nur geringe MZM-Bildung zu verzeichnen. Im Hinblick auf die später zu erörternde Fermentwirkung bei der Farbstoffbildung ist jedenfalls interessant, daß der Tyrosinase-Hemmstoff KCN die MZM-Synthese, As_2O_5 jedoch, das die Polyphenoloxydase nicht hemmt (DAWSON u. MAGEE 1955), die Farbstoffbildung fördert.

5. Die Rolle des Sauerstoffs bei der Farbstoff- oder MZM-Bildung ließ sich durch Verminderung der Sauerstoffspannung mittels N_2 -Atmosphäre mit und ohne Pyrogallolzusatz und durch Oberflächenkultur mit und ohne Belüftung nachweisen. Dabei ergab sich, daß niedrigere Sauerstoffspannungen die Farbstoffbildung stark, die Kristallsynthese

aber nicht hemmen. Bereits durch geringe einmalige Belüftung, die möglicherweise aber auch durch Entfernen gasförmiger Hemmstoffe über dem Mycel wirksam sein kann, kommt es zu einer Förderung von Wachstum und MZM-Produktion. Bei stärkerer Belüftung jedoch überwiegt schließlich die Farbstoffbildung eindeutig, während die MZM-Synthese mehr und mehr unterdrückt wird.

Dieses Ergebnis stimmt ausgezeichnet mit der Feststellung überein, daß Kristalle vor allem durch Submersmycel gebildet werden, während reines Oberflächenmycel bevorzugt den Farbstoff hervorbringt. Auf die besonderen Bedingungen der Schüttelkultur, bei der schließlich die MZM-zugunsten der Farbstoffbildung völlig unterdrückt wird, soll bei den Fermentuntersuchungen näher eingegangen werden.

Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der primären und dem der sekundären Stoffwechselprodukte lassen sich bei *Lent. lep.* kaum entdecken. Zwar konnten ebenfalls alle durch EBERHARDT (1956) bereits identifizierten und teilweise als Vorläufer von MZM postulierten Zwischenprodukte nachgewiesen werden, doch ist deren Auftreten für sich noch kein Beweis für ihre „precursor“-Natur. Ein eindeutiger Anstau dieser Verbindungen durch die veränderten Kulturbedingungen, der auf Beziehungen zu den daraus gespeisten sekundären Stoffen schließen läßt, war nicht zu verzeichnen. Augenscheinlich ist der Grundstoffwechsel außerordentlich anpassungsfähig und der Anfall der daraus resultierenden freien primären Stoffe, abgesehen von den allgemeinen Veränderungen während des Wachstums, von einer bemerkenswerten Konstanz. Selbst eine Verbindung wie die Sedoheptulose und ihre Phosphate, die als Vorläufer aromatischer Körper nachgewiesen sind (DAVIS 1955), und die EBERHARDT (1955, 1956) in das Biosyntheschema des MZM einfügte, ließen keine Beziehung zwischen ihrem Auftreten und der MZM-Produktion erkennen.

Von den sekundären Stoffwechselprodukten, denen unter Umständen die Rolle eines Zwischenproduktes bei der MZM- oder Farbstoffsynthese zukommt, hat erst kürzlich SHIMAZONO (1959) berichtet und dem Methyl-ester der p-Cumarsäure eine wesentliche Bedeutung zugemessen. SHIMAZONO konnte durch Isotopenversuche wahrscheinlich machen, daß *Lent. lep.* aus dem p-Cumarsäureester durch Methylierung den MZM bildet. Ferner gelang es diesem Autor, die enzymatische Oxydation des p-Cumarsäureester zu einem braunen Farbstoff mit Mycelextrakten aus *Lent. lep.* durchzuführen. Auf Grund der Hemmung der Reaktion durch CN^- oder durch anaerobe Verhältnisse hält SHIMAZONO es für wahrscheinlich, daß Tyrosinase die Farbstoffbildung bei *Lent. lep.* bewirkt oder mindestens einleitet. Eigene Untersuchungen hatten in der Tat auch schon früher Zusammenhänge zwischen der Farbstoffsynthese bei *Lent. lep.* und dem Vorhandensein einer Tyrosinase ergeben. Sie ergänzen zusammen mit

neueren Versuchen eindrucksvoll die Ergebnisse von SHIMAZONO und bestätigen weitgehend seine Folgerungen.

Die allgemeine Prüfung auf Phenolasen (siehe Methode) ergab im Substrat höchstens zum Zeitpunkt der Autolyse eine gewisse Aktivität, während Mycel- bzw. Mycelextrakte, Dopa rasch und leicht, Tyrosin etwas langsamer und p-Cresol erst nach einer gewissen Induktionszeit oxydierten. Das p_H -Optimum der Reaktion liegt im allgemeinen etwa zwischen p_H 5,2 und 5,6, selten bei einem höheren p_H (etwa 6,8).

Tabelle 12. Tyrosinaseaktivität von *Lent. lep.*-Kulturen verschiedener Entwicklungsstadien auf Normalnährlösung

Mycel- gewicht in mg	p_H der Nähr- lösung	Farbe der Nährlösung	MZM- Kristall- bildung	Phenole in der Nährlösung	Tyrosinaseaktivität im Mycel- extrakt gegen p-Cresol bei p_H		
					4,2	5,6	6,8
15	4,7	farblos	—	—	—	—	—
50	4,6	gelblich	—	—	—	Spur	—
75	3,8	gelb	sehr stark	Spur IFM*	0,12	0,26	0,02
75	3,8	hellbraun	—	Spur IFM*	0,3	0,5	0,3
160	5,3	hellbraun	—	Spur IFM*	0,31	0,76	0,16
170	5,9	dunkelbraun	—	—	0,4	0,7	0,23

* = iso-Ferulasäuremethylester.

Eine geringe Oxydation von Guajacol erfolgt gelegentlich nach einer Einwirkungszeit von 2 Tagen, allerdings nur bei niederen p_H -Werten. Durch Dialyse gereinigte Enzymzubereitungen reagieren mit p-Cresol noch langsamer, als unbehandelte Mycelextrakte. Diese Eigenschaften weisen alle auf eine o-Polyphenyloxydase hin (HERRMANN 1954), was den Befunden von SHIMAZONO insofern nicht widerspricht, als dieses Enzym unter bestimmten Bedingungen auch die Oxydation von Monophenolen katalysieren kann. Wie die Versuche zeigten, sind diese Bedingungen bei *Lent. lep.* in der Tat gegeben. Die quantitativen Messungen der Tyrosinaseaktivität wurden daher zur Erfassung der Wirkung gegenüber Monophenolen photometrisch und manometrisch grundsätzlich an p-Cresol als Substrat durchgeführt.

Die Aktivität des Enzyms steigt im allgemeinen mit dem Pilzwachstum bis zu einem Maximum an (Tab. 12). Die Tabelle zeigt, daß bei gleichem p_H des Substrates und etwa demselben Gehalt an freien phenolischen Verbindungen dieselbe Mycelmenge mit MZM-Kristallen eine wesentlich geringere Tyrosinaseaktivität aufweist, als ohne MZM. Vergleicht man die Fermentaktivität in den drei verschiedenen Pufferlösungen, so fallen gewisse Verschiebungen des Optimums im Laufe der Entwicklung auf. Auch kann das Enzym gegenüber verschiedenen Substraten unterschiedlich reagieren. Mit Tyrosin und Dopa bildet sich als Reaktionsprodukt

ein grauer oder schwarzer Niederschlag von Melanin, der ohne diese Zusätze bei *Lent. lep.* nicht entsteht. Durch die Oxydation des p-Cresols entsteht dagegen ein wenigstens farblich dem natürlichen Farbstoff entsprechendes Produkt.

Sowohl die eigenen Untersuchungen (SPRECHER 1957), wie die von SHIMAZONO (1959) hatten ergeben, daß Schüttelkulturen nicht nur die

Tabelle 13. *Tyrosinaseaktivität von Lent. lep. in Normalnährlösung mit und ohne Zusatz von MZM*

Alter des Impf- stückes in Tagen	Zusatz von MZM g	Alter der Kultur in Tagen	pH der Nähr- lösung	Farbe der Nährlösung	Phenole in der Nährlösung	Tyrosinaseaktivität im Mycelextrakt gegen p-Cresol bei pH		
						4,4	5,6	6,8
a) in Schüttelkultur								
17	0,1	7	4,4	gelb	IFM* 0,5	—	—	—
17	—	7	4,2	dunkelgelb	IFM 1	—	—	—
17	0,1	16	4,0	gelb	IFM 1	—	Spur	—
17	—	16	4,0	rotbraun	IFM 5	0,12	0,5	0,16
150	0,1	7	5,0	gelbbraun	—	0,05	0,26	0,12
150	—	7	5,1	dunkelgelb	—	0,02	0,04	0,01
150	0,1	16	4,1	gelbbraun	IFM 1,5	0,01	0,03	—
150	—	16	4,0	gelbbraun	pCM* 1,5	0,04	0,21	0,03
b) in Oberflächenkultur								
17	0,1	7	4,6	farblos	—	—	—	—
17	—	7	4,7	farblos	—	—	—	—
17	0,1	16	4,5	leicht	IFM Sp.	—	—	—
17	—	16	4,7	gelblich	IFM 0,5	—	—	—
150	0,1	7	4,9	dunkelgelb	—	0,02	0,1	0,1
150	—	7	4,7	dunkelgelb	—	0,02	0,1	0,11
150	0,1	16	4,4	dunkelgelb	IFM Sp.	—	—	—
150	—	16	4,7	gelblich	IFM 1	0,02	0,05	0,06

* = IFM = iso-Ferulasäuremethylester

pCM = p-Cumarsäuremethylester und drei weitere Phenole.

Farbstoffbildung fördern, sondern auch die MZM-Synthese unterdrücken und sogar gebildete Kristalle wieder zum Verschwinden bringen. Durch Zusatz von MZM zu Oberflächen- und Schüttelkulturen sollte eine eventuelle Wirkung dieser Verbindung auf die Tyrosinaseaktivität nachgewiesen werden. Für die Untersuchung wurde junges, weißes oder physiologisch älteres, braunes Mycel als Impfmateriel verwendet. Das Impfstück entsprach jeweils etwa 10 mg Myceltrockengewicht (Tab. 13). Die Ergebnisse zeigen, daß älteres Mycel relativ viel Tyrosinase mitbringt. In den Oberflächenkulturen kommt es, trotz des Neuzuwachses, zunächst zu einer Verringerung der Fermentaktivität. Dies bestätigt eindeutig den bereits aus Tab. 12 gewonnenen Eindruck, daß junges *Lent. lep.*-Mycel

nur geringe Tyrosinaseaktivität aufweist. Der Rückgang der Phenolaseaktivität ist in Schüttelkulturen nur dann zu beobachten, wenn diesen zuvor einige MZM-Kristalle zugesetzt wurden. Ohne MZM tritt unter diesen Bedingungen eine Aktivitätssteigerung ein. Schüttelkulturen mit 17 Tage altem, weißem Mycel verhalten sich ebenso, während Oberflächenkulturen, die aus gleichaltem Mycel hervorgingen, keine Fermentaktivität besitzen.

Die bis jetzt gewonnenen Ergebnisse berechtigen zu folgenden Schlüssen: 1. Die Tyrosinaseaktivität entspricht in Oberflächenkulturen etwa der Menge und dem physiologischen Alter des Mycels. 2. Unter den Bedingungen der Schüttelkultur wird die Aktivität dieses Fermentes bei kräftig wachsendem Mycel weit über das normale Maß hinaus gefördert. 3. MZM hemmt dagegen die Tyrosinaseaktivität gerade im ersten Wachstumsstadium und reduziert sie, wenn man die MZM-Kristalle älteren tyrosinasehaltigen Kulturen zusetzt.

Damit findet auch der Befund von SHIMAZONO (1959), daß der p-Cumarsäuremethylester nur in MZM-haltigen Schüttelkulturen nachweisbar ist, eine eindeutige Erklärung. Durch die vorübergehende Hemmung der Tyrosinase kommt es unter diesen Bedingungen zunächst nur zu einer Entmethylierung des MZM. Da die Weiteroxydation des dadurch entstandenen p-Cumarsäureesters in diesem Zeitraum unterbleibt, sammelt er sich kurzfristig im Substrat an.

Die außerordentlich starke Tyrosinaseaktivität in Schüttelkulturen legt die Frage nahe, inwieweit das verstärkte O₂-Angebot oder andere Faktoren dafür verantwortlich sind. Durch Belüftung von Oberflächenkulturen wurde diesen eine größere Sauerstoffmenge zugeführt, als ihnen unter Normalbedingungen zur Verfügung steht, doch ergab dies keine wesentliche Steigerung der Cresolaseaktivität. Eine Einschränkung der Fermenttätigkeit kann dagegen dann erwartet werden, wenn den Enzymen nur beschränkte Mengen von Vorstufen, Wasserstoffüberträger oder Sauerstoff zur Verfügung stehen. In rasch wachsenden Mycelien von Oberflächenkulturen könnte dieser Fall durch Diffusionsschwierigkeiten durchaus eintreten, zumal die Tyrosinase nur im Mycel lokalisiert ist. Die relativ große Oberfläche der aus dauernd bewegten, kleinen Flöckchen bestehenden Schüttelkulturen beseitigt diesen Engpaß. Hierin dürfte wohl der Hauptgrund für die erhöhte Tyrosinaseaktivität in Schüttelkulturen zu suchen sein. Eine Bestätigung dieser Vermutung erbrachte die Untersuchung von zwei Schüttelkulturen, die sich nur dadurch unterschieden, daß in einem Fall dünne Mycelflöckchen, im anderen aber eine kompakte Mycelkugel geschüttelt wurde. Obwohl die dichte Mycelmasse gegenüber der fein verteilten das doppelte Trockengewicht aufwies, war doch ihre Tyrosinaseaktivität nur halb so stark.

Zu dieser Vorstellung paßt sehr gut, daß nach völligem Verbrauch der C-Quelle und mit Wiederaansteigen des pH-Wertes, jedoch noch vor der Autolyse, die Tyrosinaseaktivität in Schüttel- und Oberflächenkulturen das Maximum erreicht. Nach dem Aufhören der starken Zellvermehrung ist ja die Stoffbilanz in der Kultur ausgeglichener. Zusätzlich kann die verstärkte Tyrosinaseaktivität auch noch mit der gesteigerten Permeabilität älterer Zellen zusammenhängen. Ein Bild der gegensätzlichen

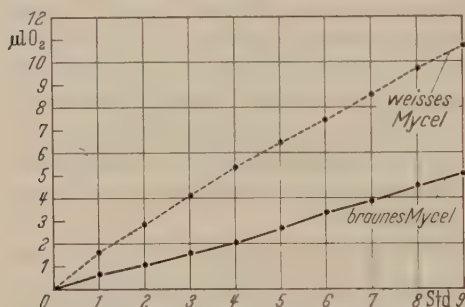


Abb. 1. Sauerstoffverbrauch bei der enzymatischen Oxydation von p-Cresol durch weißes bzw. braunes *Lent. lep.*-Mycel

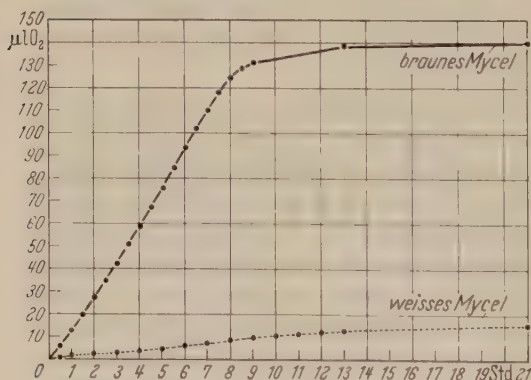


Abb. 2. Sauerstoffverbrauch bei der Veratmung von Glucose durch weißes bzw. braunes *Lent. lep.*-Mycel

Verhältnisse zwischen jungen und alten Kulturen gibt der O₂-Verbrauch während der Zuckeratmung einerseits und der enzymatischen p-Cresoloxydation andererseits (Abb. 1 und 2).

Vergleicht man die fluorescierenden phenolischen und nichtphenolischen Bestandteile des Ätherextraktes aus dem Substrat verschieden behandelten Oberflächenkulturen chromatographisch, so kann man im Verlauf des Wachstums ihre Zunahme bis zu einem Optimum feststellen, das etwa mit dem der Tyrosinaseaktivität zusammenfällt. Zahl und Menge dieser Stoffe verringert sich dann anschließend, und es treten dafür fünf verschiedene gelbe bis

braune Farbstoffkomponenten auf. Der Farbstoffkomplex löst sich unter Farbvertiefung besonders gut in starken Alkalien, dagegen kaum in organischen Lösungsmitteln. Die Untersuchungen über die Natur des Farbstoffes sind noch im Gange.

Von den phenolischen Verbindungen im Substrat konnten in Übereinstimmung mit SHIMAZONO (1959) Isoferulasäuremethylester und p-Cumarsäuremethylester chromatographisch nachgewiesen werden. Unter gewissen Umständen wurde auch die p-Cumarsäure gefunden. Zwei weitere phenolische Verbindungen konnten bis jetzt nicht identifiziert werden.

Tabelle 14. Phenole und Tyrosinaseaktivität in Oberflächenkulturen von *Lent. lep.* mit verschiedenen Zusätzen

Zugesetzte Verbindung	ohne	Chinasäure	Shikimisäure	Zimtsäure	MZM	p-Cumarsäure	Caffeesäure
a) junge Kulturen							
Myceltrockengewicht in Milligramm	184	192	164	74	79	69	119
pH der Nährlösung	4,3	3,8	3,9	4,4	3,9	4,7	4,8
Farbe der Nährlösung	leicht bräunl.	hellbraun	hellbraun	leicht gelbl.	dunkelgelb	Sp. gelblich	gelb
MZM-Kristalle	—	—	—	2	2	—	3
IFM*	0,5	4	4	1,5	4	—	1,5
pCM**	—	—	—	—	—	1	—
p-Cumarsäure	—	—	—	—	—	0,5	—
Phenol c	—	g. Sp.	0,5	—	0,5	—	—
Phenol e	g. Sp.	1	1	0,5	Spur	2	1
Farbstoff im Mycel	0,5	0,7	2	—	0,5	—	—
	0,5	0,5	1,5	—	0,5	—	—
Tyrosinaseaktivität	—	—	—	—	—	—	—
bei pH 4,4	0,025	0,21	0,18	—	0,07	—	0,015
5,6	0,24	0,36	0,39	—	0,19	—	0,05
6,8	0,01	0,35	0,41	—	0,13	—	0,018
b) ältere Kulturen							
Myceltrockengewicht in Milligramm	196	240	214	130	16	116	150
pH der Nährlösung	5,9	4,1	3,8	3,8	5,9	4,5	6,1
Farbe der Nährlösung	braun	hellbraun	hellbraun	dunkelgelb	dunkelbraun	hellgelb	rotbraun
MZM-Kristalle	3	—	—	—	1	—	—
IFM*	5	3,5	3,5	4	5	—	—
pCM**	—	—	—	—	—	0,5	—
p-Cumarsäure	—	—	—	—	—	1	—
Phenol c	—	—	—	0,5	—	—	—
Phenol e	Spur	Spur	Spur	0,5	—	—	—
Farbstoff im Mycel	0,7	2,5	3,5	0,5	0,5	Spur	0,7
	0,5	2,5	3	0,5	0,5	—	—
Tyrosinaseaktivität	—	—	—	—	—	—	—
bei pH 4,4	—	0,29	0,13	0,18	0,38	0,05	0,505
5,6	—	0,53	0,28	0,4	0,82	0,1	0,75
6,8	—	0,5	0,5	0,41	0,18	—	0,31

* IFM = iso-Ferulasäuremethylester. — ** pCM = p-Cumarsäuremethylester.

Durch die Analyse der Kulturen nach Zugabe einiger der gefundenen Stoffwechselprodukte und anderer möglicher Zwischenprodukte waren weitere Aufschlüsse über den Stoffwechsel, der einerseits zu Farbstoffen, andererseits zu MZM führt, zu erwarten (Tab. 14a).

Interessanterweise tritt nach Zusatz von Caffeensäure zunächst kaum eine Farbstoffbildung ein, obwohl dies nach dem Biosyntheseschema von SHIMAZONO (1959) zu erwarten wäre. Im Gegenteil ist diese Säure die einzige der untersuchten Verbindungen, die in diesem Wachstumsstadium eine starke MZM-Synthese hervorruft. Möglicherweise verschiebt ihr Überangebot das Reaktionsgleichgewicht zwischen dem p-Cumarsäureester, dem MZM und dem Caffeensäureester zugunsten der MZM-Bildung. Es konnte jedoch erwartet werden, daß durch die Bedingungen der Schüttelkultur in Analogie zu der dadurch beschleunigten Oxydation des MZM, auch dieses Diphenol rasch in den Stoffwechsel einbezogen würde. Das war tatsächlich der Fall. Der Pilz bildet in Schüttelkulturen auch nach Caffeensäurezugabe kein MZM, vielmehr entsteht sofort ein brauner Farbstoff. Gleichzeitig läßt sich eine entsprechende Tyrosinaseaktivität nachweisen. Selbst aus der p-Cumarsäure entsteht unter diesen Bedingungen ein Farbstoff, jedoch ohne daß dabei eine Fermentaktivität gegen p-Cresol auftritt.

Im Gegensatz zu Oberflächenkulturen waren in Schüttelkulturen höchstens in Ausnahmefällen noch freie Phenole nachzuweisen. Die enzymatische Oxydation der Phenole ist offenbar durch längeres Schütteln so stark begünstigt, daß kaum Zwischenprodukte liegen bleiben. Allerdings entsprechen sich hier, wie auch in den Oberflächenkulturen, Farbstoffbildung und Cresolaseaktivität nicht immer.

Die Untersuchung der in Tab. 14a aufgeführten Kulturen zu einem späteren Zeitpunkt rundet das vorläufige Bild zunächst ab (Tab. 14b). Hier werden die bereits zuvor gemachten Befunde im wesentlichen bestätigt. In den Kulturen ohne Zusätze kam es zu einer starken Ausbildung von MZM-Kristallen; erwartungsgemäß ging dabei die Tyrosinaseaktivität zurück. Im Gegensatz dazu nahmen die MZM-Kristalle sowohl in den „MZM“- als auch in den „Caffeensäurekulturen“ ab, während gleichzeitig Tyrosinaseaktivität und Farbstoffproduktion stark anstiegen. Eine Ausnahme bildet die p-Cumarsäure, die immer nahezu unverändert in den Kulturen nachzuweisen war.

Allgemein lassen sich nunmehr die verschiedenen Befunde zusammenfassen: Bei Zusätzen von MZM-Kristallen, p-Cumarsäure und bis zu einem gewissen Grad auch von Caffeensäure zu *Lent. lep.*-Kulturen ist unter den Bedingungen der Oberflächenkultur gegenüber Kontrollen relativ lange Zeit keine Tyrosinaseaktivität gegen p-Cresol nachweisbar. Dies liegt sicher zum Teil an der Schwerlöslichkeit dieser Verbindungen

in der Kulturflüssigkeit. Da MZM, p-Cumarsäure und Zimtsäuremethylester als Einzelsubstanzen aber auch von gereinigter Pilztyrosinase (WORTHINGTON) nicht verändert werden und p-Cresol wie auch Caffeensäure allein erst nach einer gewissen Latenzperiode reagieren, besteht darüber hinaus die Möglichkeit, daß eine Tyrosinase unter den verschiedenen Kulturbedingungen zwar vorhanden, aber nicht aktiv ist, weil gleichzeitig einige „Aktivatoren“ fehlen. Papierchromatographische und enzymatische Vorversuche lassen dies durchaus möglich erscheinen.

Das Vorhandensein einer Substrat- und Myselfärbung ohne Cresolaseaktivität weist ferner auf die Möglichkeit einer Farbstoffbildung auch ohne die katalysierende Wirkung dieses Enzyms hin. Weitere Untersuchungen sollen zunächst den über die Tyrosinase führenden Weg vollends sicherstellen und dann prüfen, inwieweit gegebenenfalls eine spontane Reaktion zwischen o-Chinonen und Monophenolen (KERTÉSZ 1952) eine nichtenzymatische Oxydation bewirken kann. Einige Anzeichen deuten außerdem auch auf die Möglichkeit hin, daß die Tyrosinase unter bestimmten Umständen den Schwerpunkt ihrer Aktivität zwischen dem einer Cresolase und einer Catecholase verschieben kann (NELSON u. DAWSON 1944).

3. Wirkungen der ausgeschiedenen Verbindungen auf fremde Organismen

Da viele Pilze Substanzen ausscheiden, die auf andere Organismen antibiotisch wirken, lag es nahe, auch die drei verwendeten Pilze und die von ihnen produzierten Verbindungen in ihrer Wirkung auf verschiedene Bakterien zu prüfen. Bei *Lent. lep.* zeigte weder das unbehandelte noch das 3 min gekochte Substrat autolysierender oder kräftig wachsender Kulturen eine nennenswerte Hemmung auf die untersuchten Testorganismen. Auch die p-Cumarsäure und der MZM in gesättigten wäßrigen Lösungen geben wohl infolge ihrer geringen Wasserlöslichkeit kaum einen antibiotischen Effekt. *Bac. mesentericus* wurde im Cylindertest durch *Lent. lep.*-Substrat sogar gefördert.

Ein ähnliches Bild bietet sich bei den Ascomyceten. Auch hier hemmt keine der verschiedenen Substratzubereitungen. Nur die gesättigte MHK-Lösung zeigt eine geringe antibiotische Wirkung gegenüber *Bact. proteus*. Dagegen fördert besonders das Substrat kräftig wachsender *Cer. coer.*-Kulturen eine ganze Anzahl der Testorganismen, insbesondere im Cylindertest- und im Lochtest.

In Mischkulturen mit verschiedenen Holzzerstörern war ein ausgesprochener Hemmeffekt durch *Lent. lep.* in keinem Falle festzustellen.

Diese in der Kultur unter optimalen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse lassen sich zwar nicht ohne weiteres auch auf die natürlichen

Verhältnisse übertragen, doch ist wahrscheinlich, daß keiner der ausgeschiedenen Substanzen im Konkurrenzkampf der Organismen eine besondere Rolle als Antibioticum zukommen dürfte.

C. Diskussion

Im allgemeinen werden die sogenannten sekundären Stoffwechselprodukte in ihrer Masse als Exkrete, also als Stoffwechselendprodukte, angesehen. RAISTRICK (1949) folgerte jedoch aus seinen umfangreichen Untersuchungen, daß diese Stoffe bei Pilzen keineswegs Nebenprodukte ohne weitere biologische Bedeutung seien. Er begründet diese Aussage mit der Menge, in der diese Stoffe oftmals anfallen, und daß sie häufig wieder völlig verschwinden und zum Teil sogar veratmet werden. Einige dieser Stoffwechselprodukte könnten eine Rolle als Antibiotica spielen, andere möglicherweise an Redoxprozessen in der Zelle beteiligt sein.

Bei keinem der in vorliegender Arbeit untersuchten Organismen oder Stoffe konnte jedoch ein antibiotischer Effekt festgestellt werden. Eben- sowenig ließ sich eine wesentliche Rolle in einem lebenswichtigen Vorgang nachweisen. Im Gegenteil ergaben bei *Cer. coer.* und *End. vir.* die Kulturen mit geringer Produktion an sekundären Stoffen höhere Mycelgewichte. Damit scheinen, wie bereits früher an einer höheren Pflanze festgestellt (SPRECHER 1956), auch bei den untersuchten Pilzen die sekundären Stoffwechselprodukte im „overflow metabolism“ anzufallen, wie dies bei einigen freien primären Stoffen bereits nachgewiesen werden konnte (SPRECHER 1961). Ein möglicher Nutzeffekt für den betreffenden Organismus ist damit rein akzessorisch.

Auch die Ausscheidung bzw. Abscheidung (KISSER 1958) der sekundären Produkte unterliegt genau denselben Gesetzen, wie wir sie schon bei den primären Stoffen festgestellt haben (SPRECHER 1960, 1961). Sie ist eine Frage der Löslichkeit und der Reaktionsfähigkeit der betreffenden Verbindung. Ob die ausgeschiedenen Produkte wieder weiterverändert werden, hängt im wesentlichen von der allgemeinen Stoffwechsellage ab, was besonders schön bei den niederen Carbonsäuren (SPRECHER 1961) und beim p-Methoxyzimtsäuremethylester zum Ausdruck kommt.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zwingen nach Vergleich mit der Literatur zu dem Schluß, daß jeder Ausscheidung der von FOSTER (1949) postulierte „overflow“-Mechanismus zugrunde liegt. Dabei unterscheiden sich primäre und sekundäre Stoffwechselprodukte nicht grundsätzlich, sondern lediglich graduell, indem die primären Produkte meist relativ leicht wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden können. Ob eine ausgeschiedene Verbindung schließlich als Endprodukt liegen bleibt, ob sie wieder veratmet, in Redoxvorgänge eingeschaltet oder als Antibioticum verwendet wird, hängt ausschließlich von ihrer Reaktionsfähigkeit und der jeweils gegebenen Stoffwechsellage ab.

Durch diese Überlegungen ergeben sich schließlich auch enge Beziehungen zwischen dem „overflow“-Mechanismus und der Bildung von Reservestoffen, was STEINER (1957) bezüglich der Fette bereits zeigen konnte.

Der „overflow“ ist sicher in den meisten Fällen nicht eine allgemeine, sondern mehr eine örtliche Erscheinung, indem an Orten intensiven Stoffwechsels z. B. durch O_2 -Defizit ein Anstau bestimmter Verbindungen erfolgt und auf der anderen Seite jeder mögliche H-Acceptor gebraucht wird (HEWITT 1950). Ebenso können Diffusionsschwierigkeiten oder Hemmstoffkonzentrationen (LANG 1953) eine Rolle spielen, was gerade die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen an *Lent. lep.* beweisen. Unter den Bedingungen eines örtlich begrenzten O_2 -Defizits hat möglicherweise die bereits erwähnte Hypothese von v. GUTTENBERG (1951) auch für die Methylheptenylketon-Entstehung eine gewisse Bedeutung.

Als Stütze und gleichzeitige Begrenzung der hier entwickelten Vorstellungen kann der aus den vorliegenden Untersuchungen in Übereinstimmung mit PAECH (1950) gewonnene Befund gelten, daß die sekundären Stoffwechselprodukte nicht einfach die Begleiter hoher Kohlenhydratansammlungen sind, würde doch sonst bereits eine höhere Glucosegabe ihre verstärkte Produktion bewirken. Sie sind vielmehr Zeugen eines intensiven, aber nicht optimal koordinierten Stoffumsatzes. — Damit erscheint allerdings PAECHs Bezeichnung „luxurierender Stoffwechsel“ nicht ganz glücklich gewählt, handelt es sich doch weniger um einen „Überfluß“-Luxus, als vielmehr um eine Überlaufreaktion im Sinne von FOSTERS „overflow metabolism“ (FOSTER 1949).

Die Diskrepanz zwischen der oben zitierten Ansicht von RAISTRICK, die sekundären Stoffwechselprodukte der Pilze seien meist nicht Endprodukte, und der verbreiteten Anschauung, die Masse dieser Stoffe wären Exkrete, die nicht weiter verändert würden, kann nunmehr beseitigt werden. Bei höheren und niederen Pflanzen werden Stoffe ausgeschieden, die unter Umständen als Endprodukte des Stoffwechsels liegen bleiben können. In ungleich stärkerem Maße wie bei den höheren Pflanzen können sich jedoch bei den Pilzen die Stoffwechselsituationen ändern, womit bei ihnen auch wesentlich mehr die Möglichkeit gegeben ist, ausgeschiedene Stoffe wieder umzuwandeln.

Zusammenfassung

An den beiden Ascomyceten *Endoconidiophora virescens* Davids. und *E. (Ceratocystis) coerulescens* Münch, sowie an dem Basidiomyceten *Lentinus lepideus* L. wurden Synthese und Ausscheidung sekundärer Stoffwechselprodukte untersucht.

Am Beispiel des mit den Terpenen verwandten Methylheptenon und des p-Methoxyzimtsäuremethylesters sowie eines aromatischen Farbstoffes ließ sich zeigen, daß diese chemisch und hinsichtlich des Biosyntheseweges verschiedenen Verbindungen im „overflow metabolism“ entstehen und ausgeschieden werden.

Gegenüber den primären Stoffwechselprodukten lassen sich Biogenese und Ausscheidung der sekundären Stoffe wesentlich stärker beeinflussen. Unter gewissen Bedingungen kann sogar die Synthese bestimmter Verbindungen völlig unterbleiben.

Eine nennenswerte antibiotische oder wesentliche metabolische Aktivität ausgeschiedener Stoffwechselprodukte liegt bei den drei Pilzen nicht vor.

Die Ergebnisse wurden mit den Befunden anderer Autoren verglichen und die gemeinsamen Grundlagen aller pflanzlichen Stoffausscheidungen diskutiert.

Literatur

- BIRKINSHAW, J. H., and W. P. K. FINDLAY: *Biochem. J.* **34**, 82 (1940).
 BIRKINSHAW, J. H., and E. N. MORGAN: *Biochem. J.* **47**, 55 (1950).
 BRACKEN, A.: *The Chemistry of Micro-Organisms*. London 1955.
 BURMEISTER, J.: *Wiss. Z. d. Universität Rostock* **8**, 93 (1958/59).
 CRAMER, FR.: *Papierchromatographie*. Weinheim 1958.
 DAVIS, B. D.: *Advanc. Enzymol.* **16**, 247 (1955).
 DAWSON, CH. R., and R. J. MAGEE: *Methods in Enzymology II*, 817—827, *Plant Tyrosinase (Polyphenoloxidase)*. New York 1955.
 EBERHARDT, G.: *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2832 (1956).
 EBERHARDT, G., and F. F. NORD: *Arch. Biochem.* **55**, 578 (1955).
 FOSTER, J. W.: *Chemical Activities of Fungi*. New York 1949.
 FRANKE, W., u. W. HEINEN: *Arch. Mikrobiol.* **31**, 50 (1958).
 GEHRIG, R. F., and S. G. KNIGHT: *Nature (Lond.)* **182**, 1237 (1958).
 GUENTHER, E.: *The Essential Oils II*. New York 1949.
 GUTTENBERG, H. v.: *Lehrbuch der allgemeinen Botanik*. Berlin 1951.
 HERRMANN, K.: *Pharmazie* **9**, 670 (1954).
 HERZMANN, H.: *Phytopath. Z.* **34**, 109 (1958).
 HEWITT, L. F.: *Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry*. Edinburgh 1950.
 HOFMANN, ED., u. GG. HOFFMANN: *Naturwissenschaften* **45**, 337 (1958).
 KERTÉSZ, D.: *Biochim. biophys. Acta* **9**, 170 (1952).
 KISSER, J. G.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. 10: Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe*, S. 91—131. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1958.
 KÖHLER, H.: *Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung*. Berlin 1956.
 KREBS, G.: *Untersuchungen über die Fruchtkörperbildung, den Lack sowie Phenoloxidasen und Peroxydasen bei Ganoderma lucidum (Leyss)*. Karst. Dissertation. Karlsruhe 1960.
 LANG, K.: *Biologie und Wirkung der Fermente*, S. 1—31. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1953.
 LINDBERG, G., u. G. HOLM: *Physiol. Plantarum (Copenh.)* **5**, 100 (1952).
 LYR, H.: *Biochem. Z.* **329**, 91 (1957).
 NELSON, J. M., and C. R. DAWSON: *Advanc. Enzymol.* **4**, 99 (1944).
 PAECH, K.: *Biochemie u. Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1950.
 PRESCOTT, S. C., and C. G. DUNN: *Industrial Microbiology*. New York 1959.
 RAISTRICK, H.: *Proc. roy. Soc. B* **136**, 481 (1949/50).

- SCHULTE, K. E., u. C. B. STORP: Fette u. Seifen **57**, 36 (1955).
- SHIMAZONO, H.: Arch. Biochem. **83**, 206 (1959).
- SPRECHER, E.: Planta (Berl.) **47**, 323 (1956).
- SPRECHER, E.: 1957, unveröffentlicht.
- SPRECHER, E.: Riechstoffe u. Aromen **8**, 329 (1958).
- SPRECHER, E.: Planta (Berl.) **53**, 564 (1959).
- SPRECHER, E.: Ber. dtsh. bot. Ges. **73**, 339 (1960).
- SPRECHER, E.: Arch. Mikrobiol. **38**, 114—155 (1961).
- SPRECHER, E.: Zbl. Bakt., II. Abt. (im Druck).
- STAHL, E.: Parfümerie u. Kosmet. **39**, 564 (1958).
- STEINER, M.: Handbuch der Pflanzenphysiologie 7. Stoffwechselphysiologie der Fette u. fettähnlicher Stoffe, S. 209—279. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.
- YASUNOBU, K. R.: Pigment Cell Biology, S. 583—607. New York 1959.
- ZOCH, E.: Chemiker-Ztg. **82**, 830 (1958).

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

28. Mitteilung

Die „in vitro“-Resistenz gegen Ferrimycin

Von

E. BACHMANN und H. ZÄHNER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Oktober 1960)

Ferrimycine sind charakteristische Vertreter aus der Gruppe der Sideromycine (BICKEL u. Mitarb. 1960, 1). Sie enthalten Eisen, zeigen gekreuzte Resistenz mit Grisein (REYNOLDS u. Mitarb. 1947) und Albomycin (GAUSE u. BRAZHNİKOVA 1951), und werden durch Ferrioxamine in ihrer Wirkung aufgehoben (BICKEL u. Mitarb. 1960, 1). Sie zeigen auch das für Sideromycine charakteristische, gehäufte Auftreten von resistenten Keimen.

Rasche Entstehung von Resistenz gegen Sideromycine wurde bereits 1948 von REYNOLDS u. WAKSMAN beim Grisein beobachtet und am Beispiel von *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers eingehend untersucht. Sie fanden einen resistenten Keim auf 10^4 — 10^5 empfindliche. GARROD u. WATERWORTH (1956) bestätigten die rasche Resistenz-Entstehung beim Albomycin. SENSI u. TIMBAL (1959) veröffentlichten noch höhere Resistenzraten für die Antibiotica LA 5352 und LA 5937. In allen Fällen entstand die Resistenz in einem Schritt. Die Sideromycine sind demnach in bezug auf die Entstehung von Resistenz (Einteilung nach DEMEREC 1948) dem Streptomycin-Typus zuzuordnen, doch sind die Resistenzraten bei den Sideromycinen noch um ein bis zwei Zehnerpotenzen höher als bei Streptomycin (Zusammenstellung bei GILLISSEN u. GILLISSEN 1960).

Folgende Beobachtungen gaben den Anstoß zu den vorliegenden Untersuchungen:

1. Bei der Bestimmung der „in vitro“-Wirkung von Ferrimycin-Präparaten im routinemäßigen Verdünnungsreihentest [Fleischextrakt-Pepton-Nährlösung (Rezept im II. Abschnitt), visuelle Auswertung nach 24 und 48 Std] zeigt Ferrimycin selbst in hohen Konzentrationen keine Wirkung gegen die geprüften Keime *Bacillus subtilis* Cohn emend. Prazmowski und *Staphylococcus aureus* Rosenbach, obwohl dieselben Präparate im Plattendiffusionstest (Fleischextrakt-Pepton-Agar) gegen die gleichen Organismen hoch aktiv sind. Die gewachsenen Keime erweisen sich als Ferrimycin-resistent (Bestimmung im Plattendiffusionstest).

2. Die Empfindlichkeit von *Bacillus subtilis* gegen Ferrimycin im Plattendiffusionstest hängt vom verwendeten Nährboden ab (Tab.1). Auf einen „synthetischen“ Agar ausgesät, sinkt die Empfindlichkeit von *Bacillus subtilis* gegen Ferrimycin auf einen kleinen Bruchteil der normalen Empfindlichkeit ab (Rezept des „synthetischen“ Agars im II. Abschnitt). Werden Keime aus den Versuchen mit „synthetischem“

Tabelle 1. Die Empfindlichkeit von *Bacillus subtilis* gegen Ferrimycin auf verschiedenen Nährböden
(Plattendiffusionsteste; Filterrondellen 6 mm Durchmesser; 14 Std Inkubation bei 37° C)

Nährboden für <i>Bacillus subtilis</i>	Ferrimycin-Konzentration in γ /ml Ferrimycin „1000“				
	100	31,6	10	3	1
Fleischextrakt-Pepton-Agar	32	26	19	17	13
„synthetischer“ Agar	$\frac{0}{14}$	$\frac{0}{13}$	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{9}$
Hemmzonen in Millimeter; $\frac{0}{-}$ = inkomplette Zonen					

Agar aus der Umgebung der mit Ferrimycin imprägnierten Filterrondellen isoliert und im Plattendiffusionstest (Fleischextrakt-Pepton-Agar) auf Ferrimycin-Resistenz geprüft, so erweisen sie sich als voll Ferrimycin-empfindlich.

3. Ferrimycin wirkt im Gegensatz zu Grisein und Albomycin vorwiegend nur auf gram-positive Organismen.

Diese Beobachtungen lassen auf drei Möglichkeiten für das Auftreten einer Resistenz von Mikroorganismen gegen Ferrimycin schließen: 1. Durch Ferrimycin werden resistente Zellen selektioniert, deren Resistenz erhalten bleibt (induziert genotypische Resistenz). 2. Auf bestimmten Nährböden tritt eine Resistenz gegen Ferrimycin auf, die nicht genetisch fixiert ist und bei Übertragung der Keime auf andere Nährböden wieder verschwindet (Ernährungs-bedingte, nicht genotypische Resistenz). 3. Bestimmte Keime sind in ihrer „natürlichen“ Population gegen Ferrimycin resistent, z. B. die gram-negativen Organismen (natürliche, genotypische Resistenz).

Die unspezifische Inaktivierung von Antibiotica mit Serum oder anderen Zusätzen wie sie häufig bei Prüfung von Tuberculostatica beobachtet wird, darf nicht mit der von uns beobachteten Nährboden-abhängigen Resistenz von *Bacillus subtilis* gegen Ferrimycin verwechselt werden.

I. Die induziert genotypische Resistenz

Untersuchungen über Resistenz von Mikroorganismen gegenüber Ferrimycin haben den folgenden Besonderheiten dieser Substanz Rechnung zu tragen: 1. Ferrimycin ist in wässrigen, gepufferten Lösungen im pH-

Bereich 6—8 wenig beständig (BICKEL u. Mitarb. 1960, 2). 2. Sideramine, eine bei vielen Mikro- und Makroorganismen nachgewiesene Stoffgruppe (BICKEL u. Mitarb. 1960), heben die Wirkung des Ferrimycins auf. 3. Die beobachtete, Nährboden-abhängige, nicht genotypische Resistenz (siehe Abschnitt II) kann die Ergebnisse verfälschen.

Methoden

Die Wachstumskurven von *Bacillus subtilis* wurden unter dem Einfluß verschiedener Mengen Ferrimycin turbidimetrisch bestimmt. Von den ausgewachsenen Kulturen wurden Testplatten mit Fleischextrakt-Pepton-Agar hergestellt, und in bekannter Weise wurde die Ferrimycin-Empfindlichkeit bestimmt.

Impfmateriel. Sporensuspension von *Bacillus subtilis*, hergestellt nach dem üblichen Verfahren. 1 ml Sporensuspension je 100 ml Kulturlösung.

Nährlösung. Fleischextrakt-Pepton-Nährlösung: Fleischextrakt (Lab Lemco) 0,3%; Pepton 0,5%; NaCl 0,3%; Glucose 1,0%; Leitungswasser; pH 7,0, eingestellt mit Kalilauge (20%). Die Substanzen wurden gelöst, aufgekocht, abgekühlt, filtriert, abgefüllt und 20 min bei 120°C autoklaviert. Für Testplatten wird dieselbe Nährlösung unter Zusatz von 1,5% Agar verwendet.

Messungen. Die Messungen wurden im Zeiss-Spektral-Photometer bei 600 m μ im Vergleich zu unbeimpfter Nährlösung ausgeführt. In der „lag“-Phase wurden alle 2 Std, in der „log“-Phase alle Stunden Messungen ausgeführt.

Kulturbedingungen. 100 ml Nährlösung in 500 ml Erlenmeyerkolben, bei 33°C rotierend geschüttelt mit 120 Touren je Minute. Je Antibiotica-Konzentration wurden vier Parallelen getestet und alle Versuche 2—3 mal wiederholt.

Antibioticum. Ferrimycin-Präparate der Ciba A. G. Basel. Die Konzentrationen beziehen sich durchwegs auf Ferrimycin „1000“ (ein Gemisch von Ferrimycin A₁ und A₂; 600000 E/mg).

Darstellung der Versuche. Als Maß für die Ferrimycin-Wirkung kann die Verlängerung der „lag“-Phase, respektive die Verzögerung im Erreichen eines relativen Wachstums von 50% der Kontrolle festgelegt werden. Die von Versuch zu Versuch auftretenden großen Unterschiede im erreichbaren maximalen Wachstum sind für die Interpretation der Versuche ohne Bedeutung. Diese Streuungen werden eliminiert, indem der steile Teil der Wachstumskurve durch die in Annäherung zulässige lineare Regressionsgrade ersetzt wird. Dies ist nur im Bereich des Wendepunktes der Wachstumskurve zulässig. Da dieser Bereich den hier interessierenden Abschnitt des 50%igen relativen Wachstums umfaßt, wird diese Darstellung gewählt.

Ergebnisse

In Abb. 1 sind die berechneten Regressionsgeraden einer Versuchsreihe dargestellt. Ein relatives Wachstum von 50% erreichen die Kulturen von *Bacillus subtilis* ohne Ferrimycin nach 9 Std. Die Zugabe von Ferrimycin in Konzentrationen von 1; 0,1; 0,01 und 0,005 γ /ml bewirkt eine Verzögerung von 7 $\frac{3}{4}$ bis 9 $\frac{3}{4}$ Std. Die Unterschiede in der Ferrimycin-Wirkung zwischen 0,005 γ /ml und 1 γ /ml sind nicht signifikant. Die nächste, geprüfte Konzentration von 0,001 γ /ml Ferrimycin verursacht keine feststellbare Verzögerung mehr.

Eine Prüfung dieser Kulturen auf Ferrimycin-Empfindlichkeit ergibt folgendes Bild: 1. Die Zellen der Kontrollen (ohne Ferrimycin) sind noch

voll Ferrimycin-empfindlich. 2. Die Zellen aus Kulturen mit Ferrimycin-Zusätzen von $1 \gamma/\text{ml}$ bis $0,005 \gamma/\text{ml}$ sind vollständig resistent. Ob die Zellen mit $1 \gamma/\text{ml}$ oder $0,005 \gamma/\text{ml}$ Ferrimycin inkubiert werden, hat keinen Einfluß auf die Höhe der erreichbaren Ferrimycin-Resistenz. 3. Die Zellen aus Kulturen mit $0,001 \gamma/\text{ml}$ Ferrimycin sind zum größten Teil noch Ferrimycin-empfindlich, doch ist in den Hemmhöfen eine größere Zahl resistenter Kolonien erkennbar als in den Kontrollplatten.

Die Ergebnisse zeigen, daß Ferrimycin unter den eingesäten Keimen die Resistenten selektioniert, die sich dann ungestört vermehren können.

Die daraus resultierende Verzögerung dauert genau so lange, wie die resistenten Keime Zeit benötigen, um sich so weit zu vermehren, daß wieder die gleiche Zahl an Zellen vorhanden ist wie in der unbehandelten Kontrolle. Eine entsprechende dünnere Einsaat müßte daher in Abwesenheit von Ferrimycin eine analoge Verzögerung im Wachstum ergeben. Ein derartiger Versuch wurde unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 zusammengefaßt. Verdünnung der Sporensuspension auf $1:10^4$ bis $1:10^5$ ergibt eine gleiche Verzögerung des Wachstums, wie das im vorhergehenden Versuch für Ferrimycin festgestellt wurde.

Daraus ergibt sich ein resistenter Keim von *Bacillus subtilis* auf 10^4 bis 10^5 empfindliche Keime. Die Resistenzrate für Ferrimycin liegt also im gleichen Rahmen wie die von REYNOLDS u. WAKSMAN (1948) für Grisein und die von SENSI u. TIMBAL (1959) für die Antibiotica LA 5352 und LA 5937 veröffentlichten Resistenzraten.

Ein Vergleich der Regressionsgeraden der Wachstumsversuche unter dem Einfluß von Ferrimycin mit denjenigen der Versuche mit geringerer

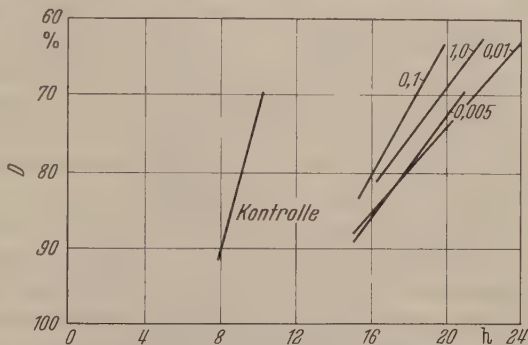


Abb. 1. Beeinflussung des Wachstums von *Bacillus subtilis* durch Ferrimycin

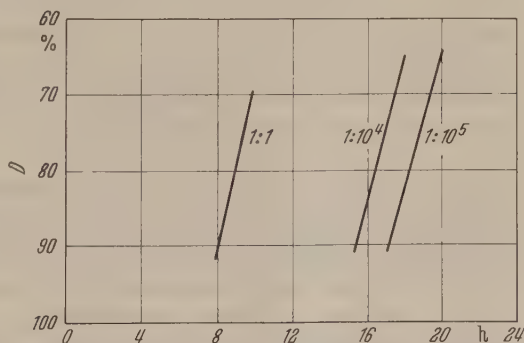


Abb. 2. Verschiebung der „log“-Phase bei *Bacillus subtilis* durch verdünnte Einsaat

Einsaat zeigt einen deutlichen Unterschied in deren Steilheit (als ein Maß der Wachstumsgeschwindigkeit). In Versuchen mit geringerer Einsaat liegen die Regressionsgeraden parallel denjenigen der Kontrollen; die „lag“-Phase ist verlängert, die Vermehrungsrate dagegen unverändert. Die Regressionsgeraden der mit Ferrimycin behandelten Kulturen verlaufen flacher als die der unbehandelten Kontrollen, ihre Vermehrungsrate ist kleiner.

Die resistenten Kulturen bleiben, auch ohne Ferrimycin-Zusätze, über mehrere Passagen resistent. Die Beobachtung, daß nach etwa 20 Passagen wieder ein großer Anteil an empfindlichen Keimen vorhanden ist, spricht nicht gegen eine genetische Fixierung der Resistenz. Das Auftreten von empfindlichen Keimen nach zahlreichen Passagen ohne Ferrimycin ist durch Rückmutationen, deren Häufigkeit wahrscheinlich der Resistenzrate entspricht, bedingt. Zudem weisen die empfindlichen Keime eine größere Wachstumsrate auf und können sich daher gegenüber den resistenten Keimen leicht durchsetzen.

Die induziert genotypisch Ferrimycin-resistenten Stämme (dies gilt sowohl für *Bacillus subtilis* als auch für *Staphylococcus aureus*) zeigen gekreuzte Resistenz gegenüber den anderen Vertretern der Sideromycine (geprüft wurde Albomycin, Grisein und A 22765). Die beobachtete natürliche genotypische Resistenz gegen Ferrimycin von *Escherichia coli* ist in ihrer Auswirkung nicht identisch mit der induziert genotypischen Resistenz bei *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*. Die induziert genotypisch resistenten Stämme von *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* sind gegen alle Sideromycine resistent, während *Escherichia coli* mit seiner natürlichen genotypischen Resistenz gegen Ferrimycin auf Albomycin und Grisein empfindlich ist.

II. Die Ernährungs-bedingte Ferrimycin-Resistenz

Die induziert genotypische Resistenz gegen Ferrimycin entspricht weitgehend den Erfahrungen mit anderen Antibiotica, mit dem einzigen Unterschied, daß die Resistenzraten für Sideromycine höher liegen als bei anderen Chemotherapeutica. Das Vorkommen einer Ernährungs-abhängigen Resistenz gegen Antibiotica hingegen war unseres Wissens nicht bekannt. Für Ferrimycin läßt sich eine solche nachweisen und auch erklären.

In Tab. 1 sind Ergebnisse von Plattendiffusionstesten mit Ferrimycin gegen *Bacillus subtilis* auf zwei verschiedenen Nährböden zusammengestellt.

Bacillus subtilis ist auf Fleischextrakt-Pepton-Agar hoch empfindlich gegen Ferrimycin, auf „synthetischem“ Agar hingegen nahezu unempfindlich. Diese Feststellung ist um so überraschender, als Antibiotica, wie Penicillin, Streptomycin, die Tetracycline, Chloramphenicol und andere

auf „synthetischen“ Medien stärker wirken als auf einem Fleischextrakt-Pepton-Nährboden.

Eine Erklärung dieser Ergebnisse kann in vier Richtungen gesucht werden: 1. Ferrimycin zerfällt ohne Beteiligung der Testkeime auf „synthetischem“ Agar bedeutend rascher als auf Fleischextrakt-Pepton-Agar. 2. Die Testorganismen bilden auf „synthetischem“ Agar relativ große Mengen an Sideraminen, während die Sideraminbildung auf dem Fleischextrakt-Pepton-Agar fehlt oder aber sehr gering ist. 3. Ferrimycin

Fleischextrakt-Pepton-Agar		„synthetischer“ Agar	
Fleischextrakt (Lab Lemco)	0,3%	K ₂ HPO ₄	0,7%
Pepton	0,5%	KH ₂ PO ₄	0,3%
NaCl	0,3%	Na-citrat. 3H ₂ O	0,05%
Glucose	1,0%	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,01%
Leitungswasser		(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 %
pH 7,0 eingestellt mit KOH	20%	Glucose	0,2 %
		pH 7,2 eingestellt mit KOH	

wird durch die Testorganismen abgebaut, wobei dieser Abbau vom Nährboden abhängt. 4. Ferrimycin induziert bei den hier verwendeten Testorganismen auf bestimmten Nährböden die Bildung von Sideraminen.

Um die erste Möglichkeit (rascher Zerfall von Ferrimycin auf „synthetischem“ Nährboden ohne Beteiligung der Testorganismen) zu prüfen, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Filterpapierstreifen (Whatman No.1) wurden mit 100 γ /ml Ferrimycin imprägniert und auf Platten aufgelegt:

- „synthetischer“ Agar ohne Testorganismus
- Fleischextrakt-Pepton-Agar ohne Testorganismus
- „synthetischer“ Agar mit *Bacillus subtilis* eingesät
- Fleischextrakt-Pepton-Agar mit *Bacillus subtilis* eingesät.

Inkubation der Platten bei 37° C. Zu Beginn der Inkubation, nach $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2, 3, 4, 6, 8 und 24 Std wurden längs der Streifen Agarblöcke ausgestantzt und auf Testplatten (Fleischextrakt-Pepton-Agar) von *Bacillus subtilis* übertragen. Diese wurden 14 Std bei 37° C inkubiert und dann ausgewertet.

Ergebnisse

Die Ferrimycin-Aktivität bleibt auf beiden Nährböden ohne Testorganismen gleichermaßen über die hier geprüfte Zeit erhalten. Wird *Bacillus subtilis* auf „synthetischem“ Agar ausgesät, so ist bereits 4 Std nach dem Auflegen der mit Ferrimycin imprägnierten Filterpapierstreifen auch in deren nächster Nähe keine Ferrimycin-Aktivität mehr nachweisbar. Dagegen bleibt auf Fleischextrakt-Pepton-Agar auch bei Anwesenheit von *Bacillus subtilis* die Ferrimycin-Aktivität erhalten. Die Unempfindlichkeit von *Bacillus subtilis* auf „synthetischem“ Agar gegenüber Ferrimycin ist also nicht auf einen raschen Zerfall des Ferrimycons ohne Beteiligung der Bakterien zurückzuführen.

Die Bildung einer Sideramin-Aktivität durch *Bacillus subtilis* wurde bereits beschrieben (ZÄHNER u. Mitarb. 1960), doch sind die gebildeten Mengen äußerst klein und reichen in keinem Falle aus, um die in unseren Versuchen eingesetzten Ferrimycin-Mengen in ihrer Wirkung aufzuheben.

Im Zusammenhang mit der zweiten aufgeführten Möglichkeit (Resistenz durch Nährboden-abhängige Sideramin-Bildung) wurde geprüft, ob *Bacillus subtilis* auf den beiden Nährlösungen (gleiche Rezepte, aber ohne Agar) unterschiedliche Mengen von Sideramin bildet. *Bacillus subtilis* wurde auf den zwei erwähnten Nährmedien in Schüttelkultur gezüchtet, die Kulturen nach dem Verfahren für Siderochrome aufgearbeitet und die erhaltenen Präparate auf ihren Gehalt an Sideraminen getestet (Testmethoden siehe ZÄHNER u. Mitarb. 1960). Die Sideramin-Bildung von *Bacillus subtilis* ist auf beiden Nährlösungen gleich, sehr klein und nicht ausreichend, um die Wirkung der im üblichen Testverfahren gerade noch nachweisbaren Ferrimycinmengen in ihrer Wirkung aufzuheben. Eine Nährboden-abhängige Sideramin-Bildung kommt daher als Erklärung der Nährboden-abhängigen Ferrimycin-Resistenz nicht in Betracht.

Eine Prüfung der dritten und vierten Möglichkeiten (Abbau des Ferrimycons durch die Testorganismen und Nährboden-abhängige Induktion einer Sideramin-Bildung durch Ferrimycin) wurde folgendermaßen versucht:

120 ml der Fleischextrakt-Pepton-Nährlösung resp. der „synthetischen“ Nährlösung wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit je 1,2 ml einer Sporensuspension von *Bacillus subtilis* beimpft und bei 33°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 Touren/min) inkubiert. Den Kulturen wurden gleichzeitig mit dem Impfmateriel steigende Mengen von Ferrimycin zugesetzt (Ferrimycin „1000“).

1. Kontrolle, beimpft, ohne Ferrimycin
2. Kultur beimpft mit Zusatz von 1 γ /ml Ferrimycin
3. Kultur beimpft mit Zusatz von 5 γ /ml Ferrimycin
4. Kultur beimpft mit Zusatz von 25 γ /ml Ferrimycin
5. Kontrolle, unbeimpft, mit Zusatz von 25 γ /ml Ferrimycin.

In festen Zeitabständen wurden den Kolben Proben von 12 ml entnommen (0 min, 30 min, 1 Std, 2 Std, 3 Std, 4 Std, 6 Std, 8 Std und 24 Std nach Beimpfen und Ferrimycin-Zugabe). 10 ml der Proben wurden nach der bei BICKEL u. Mitarb. 1960, 2 beschriebenen Methode für Sideromycine und Sideramine aufgearbeitet. Die wäßrigen Extrakte wurden papierchromatographisch und papierelektrophoretisch auf Ferrimycin und Sideramine untersucht. Ein weiterer Teil der Proben wurde im Plattendiffusionstest gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, beide auf Fleischextrakt-Pepton-Agar ausgesät, auf Ferrimycin- und Sideramin-Wirkung hin getestet (genaue Beschreibung der Testmethode, siehe ZÄHNER u. Mitarb. 1960).

Ergebnisse

1. Auf Fleischextrakt-Pepton-Nährlösung ist über die geprüfte Zeitspanne keine Abnahme der Ferrimycin-Wirkung und keine Sideramin-Bildung festzustellen, gleichgültig ob die Nährlösung beimpft oder

unbeimpft inkubiert wurde. Das gleiche Ergebnis wird mit dem induziert genotypisch Ferrimycin-resistenten Stamm von *Bacillus subtilis* erhalten.

2. Auf unbeimpfter „synthetischer“ Nährlösung bleibt die Ferrimycin-Aktivität über die geprüfte Zeitspanne voll erhalten. Eine Sideramin-Aktivität ist nicht nachweisbar.

3. In mit *Bacillus subtilis* beimpfter „synthetischer“ Nährlösung ohne Ferrimycin-Zusatz ist während der Versuchsdauer kein Sideramin zu finden.

Wird den Kulturen Ferrimycin zugesetzt, so verschwindet dies in den ersten 6—8 Std (Nachweis im Plattendiffusionstest) und an seiner Stelle kann ein Sideramin nachgewiesen werden. Ob dabei das zugegebene Ferrimycin in ein Sideramin umgewandelt wird, oder ob durch das Ferrimycin eine Sideramin-Bildung angeregt wird, kann bei dieser

Tabelle 2. „Umwandlung“ von 25 γ /ml Ferrimycin in ein Sideramin durch *Bacillus subtilis* auf „synthetischer“ Nährlösung

Zeit nach Ferrimycin-zugabe in Stunden	Ferrimycin-Test (Filterrondellen, \varnothing Hemmzone in mm)		Sideramin-Test (Bonifas-Test gegen 0,1 mg/ml Ferrimycin, Enthemmungstrecke in mm)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>St. aureus</i>
0	35	25	—	—
0,5	35	25	—	—
1	35	25	—	—
2	30	23	—	—
4	25	18	—	—
6	$\frac{0}{19}$	$\frac{0}{15}$	20	18
8	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{8}$	24	20
10	—	—	24	22
24	—	—	24	22

$\frac{0}{-}$ = inkomplette Hemmzone

Versuchsanordnung nicht entschieden werden. Tab. 2 gibt die Ergebnisse eines derartigen Versuches wieder.

Die Auftrennung der Extrakte aus Versuchen mit *Bacillus subtilis*, auf synthetischer Nähr-

lösung und unter Ferrimycin-Zusatz gezüchtet (8 und 24 Std nach Versuchsbeginn), mit Hilfe der Papierchromatographie und Papierelektrophorese bestätigt die Ergebnisse der Plattendiffusionsteste. Es läßt sich kein Ferrimycin mehr nachweisen, wohl aber ein Sideramin, das sich von den bis jetzt aus Streptomyceten bekannten Ferrioxaminen unterscheidet. In den nach 6 Std entnommenen Proben lassen sich in den Extrakten noch Ferrimycin, wie auch das Sideramin nachweisen, doch können die Versuche nicht quantitativ ausgewertet werden, da es bisher nicht gelungen ist, die Ferrimycine vollständig von den gebildeten Sideraminen abzutrennen.

In einem weiteren Versuch soll untersucht werden, ob es sich bei den beschriebenen Versuchen nicht einfach um die Auswahl der resistenten Keime handelt, da ja Ferrimycin direkt beim Beimpfen den Kulturen zugesetzt wird. Zu diesem Zwecke wurden zwei voneinander unabhängige Wege gewählt.

1. Ein wie oben beschriebener Versuch mit *Bacillus subtilis* auf „synthetischer“ Nährlösung wird nicht nur in festen Zeitabständen auf Ferrimycin- und Sideramin-Aktivität untersucht, sondern gleichzeitig werden auch die Kulturen auf ihre Ferrimycin-Empfindlichkeit geprüft. Dazu werden die Zellen aus je einem Kolben abzentrifugiert, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit der Zellsuspension Testplatten auf Fleischextrakt-Pepton-Agar gegossen und diese auf ihre Ferrimycin-Empfindlichkeit geprüft (Filterrondellen-Test). Während der ganzen

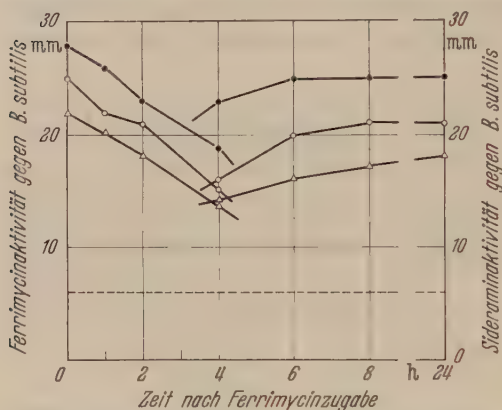


Abb. 3. Die Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin durch *Bacillus subtilis*. ●—● = 25 γ/ml Ferrimycin; ○—○ = 5 γ/ml Ferrimycin; △—△ = 1 γ/ml Ferrimycin

untersucht. Das Ergebnis eines derartigen Versuches ist in Abb. 3 zusammengefaßt. Ferrimycin wird durch ruhende Zellen auf der „synthetischen“ Nährlösung genauso in ein Sideramin umgewandelt, wie das vorher für wachsende Kulturen beschrieben worden ist. Die hier beschriebene Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin auf einer „synthetischen“ Nährlösung geschieht also unabhängig von der vorher beschriebenen Selektion der genotypisch resistenten Zellen und ist durch eine Umstellung im Stoffwechsel bedingt.

Ferrimycin wird auf bestimmten Nährböden durch Bakterien abgebaut, wobei gleichzeitig ein Sideramin entsteht. Noch nicht abgeklärt ist die Frage, ob das Sideramin durch Umwandlung aus Ferrimycin entsteht, oder ob Ferrimycin eine intensive Sideramin-Bildung induziert. Direkt läßt sich diese Frage zur Zeit nicht entscheiden, doch sprechen zahlreiche Beobachtungen für eine Umwandlung:

a) Der im nächsten Abschnitt beschriebene Abbau von Ferrimycin durch andere Bakterien (*Bacillus megaterium* de Bary und *Staphylococcus aureus*) führt ebenfalls zur Bildung eines Sideramins, das sich aber im Papierchromatogramm und in der Papierelektrophorese nicht gleich

Versuchsdauer bleiben die Zellen von *Bacillus subtilis* voll Ferrimycin-empfindlich.

2. In einem weiteren Versuch wird das Ferrimycin erst 14 Std nach dem Beimpfen der Kolben zu den Kulturen gegeben. *Bacillus subtilis* hat zu diesem Zeitpunkt bereits die Wachstumsphase abgeschlossen und befindet sich im Ruhezustand. Die Kulturen werden in festen Zeitabständen auf Ferrimycin und Sideramin hin

verhält wie das für *Bacillus subtilis* nachgewiesene und auch isolierte Sideramin.

b) Ein schonender chemischer Abbau von Ferrimycin führt zum Sideramin Z, wobei das Molekül nur wenig verändert wird (BICKEL u. Mitarb. 1960, 2). Um das durch *Bacillus subtilis* aus Ferrimycin gebildete Sideramin mit dem aus Ferrimycin entstehenden Sideramin Z vergleichen zu können, haben wir 500 mg reines Ferrimycin A₁ durch *Bacillus subtilis* auf synthetischer Nährlösung abbauen lassen und das gebildete Sideramin isoliert. Der Vergleich im Papierchromatogramm und in der Papierelektrophorese ergab folgendes: Das durch *Bacillus subtilis* aus Ferrimycin gebildete Sideramin ist verschieden von Sideramin Z, steht diesem aber näher als den Ferrioxaminen aus Streptomyceten. Die Unterschiede im Chemismus zwischen Ferrimycin, Sideramin Z und dem durch *Bacillus subtilis* aus Ferrimycin gebildeten Sideramin sind noch nicht bekannt und sollen später untersucht werden¹.

c) Die von *Bacillus subtilis* gebildete Menge an Sideramin ist proportional der eingesetzten Ferrimycin-Menge. In einzelnen Versuchen wurden bis 2500 γ /ml reines Ferrimycin A₁ eingesetzt, wobei eine entsprechend große Menge an Sideramin gebildet wurde. Da den Bakterien nicht genügend Eisen aus der Nährlösung zum Aufbau der in unseren Versuchen nachgewiesenen Sideramin-Menge zur Verfügung steht, muß mindestens das Eisen aus dem Ferrimycin zum Aufbau des Sideramins verwendet werden. Wahrscheinlicher ist aber, daß das ganze Grundgerüst des Ferrimycins übernommen wird.

Nach den hier beschriebenen Versuchen ist die Ernährungs-bedingte Resistenz von *Bacillus subtilis* gegen Ferrimycin auf eine Stoffwechsel-abhängige Umwandlung des Ferrimycins in ein Sideramin zurück-zuführen, das heißt auf eine Umwandlung eines Antimetaboliten in den dazu passenden Metaboliten.

III. Versuche über die Umwandlung von Ferrimycin durch andere Bakterien

Im vorhergehenden Kapitel wurde die Nährboden-abhängige Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin durch *Bacillus subtilis* nachgewiesen. Die hier beschriebenen Versuche hatten zur Aufgabe, aufzuklären, ob andere Bakterien ebenfalls dazu befähigt sind oder ob *Bacillus subtilis* einen Ausnahmefall darstellt. Die Versuche wurden in gleicher Weise mit *Staphylococcus aureus* und *Bacillus megaterium* wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb.4 und 5 zusammengefaßt. *Bacillus megaterium* und *Staphylococcus aureus* wandeln auf „synthetischer“ Nährlösung Ferrimycin in ein Sideramin um, wobei sowohl die Umwand-

¹ Wir möchten Herrn Dr. BICKEL, Basel, danken für die vergleichenden Papierchromatogramme.

lungsgeschwindigkeit als auch die entstehenden Sideramin-Aktivitäten die gleichen sind wie in den Versuchen mit *Bacillus subtilis*.

Escherichia coli besitzt eine natürliche Resistenz gegen Ferrimycin, nicht aber gegen Grisein und Albomycin, die ebenfalls zur Gruppe der Sideromycine gehören. Es stellte sich die Frage, ob die natürliche

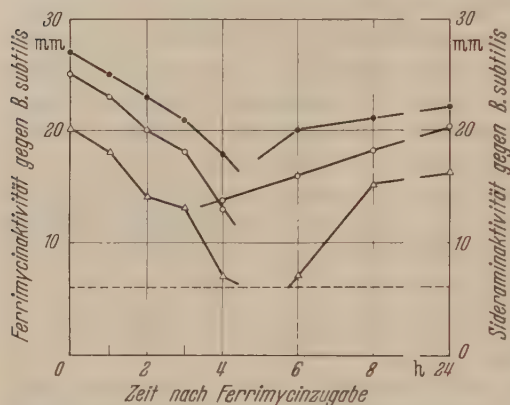


Abb. 4. Die Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin durch *Staphylococcus aureus* ● —●— = 25 µg/ml Ferrimycin, ○ —○— = 5 µg/ml Ferrimycin, △ —△— = 1 µg/ml Ferrimycin

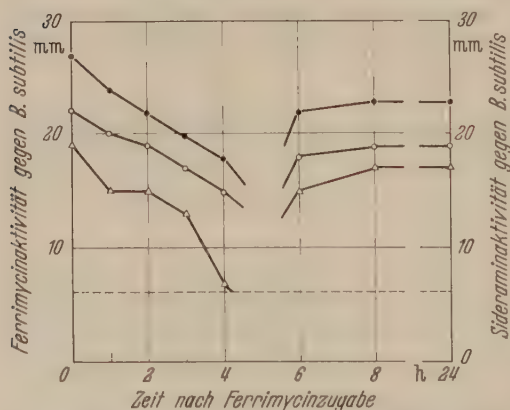


Abb. 5. Die Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin durch *Bacillus megaterium* ● —●— = 25 µg/ml Ferrimycin, ○ —○— = 5 µg/ml Ferrimycin, △ —△— = 1 µg/ml Ferrimycin

Resistenz von *Escherichia coli* gegen Ferrimycin, die nicht Nährbodenabhängig ist, ebenfalls auf einer Ferrimycin-Umwandlung beruht. *Escherichia coli* wächst nicht auf der „synthetischen“ Nährlösung. Die Versuche wurden daher nur mit Fleischextrakt-Pepton-Agar ausgeführt.

Auf unbeimpfte Platten und solche beimpft mit *Escherichia coli* wurden mit Ferrimycin getränkte Filterpapierstreifen aufgelegt und die Platten bei 37°C inkubiert. Zu Beginn der Inkubation, nach 30 min, 1 Std, 2, 3, 4, 6, 8 und 24 Std wurden längs der Filterpapierstreifen Agarblöcke ausgestanzt und auf Testplatten (Fleischextrakt-Pepton-Agar) mit *Bacillus subtilis* übertragen, diese 14 Std bei 37°C inkubiert und ausgewertet.

Ergebnisse: Ferrimycin wird auf Fleischextrakt-Pepton-Agar von *Escherichia coli* nicht abgebaut. Die Ferrimycin-Aktivität bleibt über die ganze Versuchsdauer erhalten.

In Abschnitt I wurde die induziert genotypische Resistenz von *Bacillus subtilis* gegen Ferrimycin untersucht. Zu prüfen bleibt noch das Verhalten induziert-genotypisch resistenter Bakterienstämme in bezug auf die Ferrimycin-Umwandlung. Die gleichen Versuche wurden mit je einem induziert-genotypisch resistenten Stamm von *Bacillus subtilis* und

Staphylococcus aureus wiederholt, wie das für die normal Ferrimycin-empfindlichen Stämme beschrieben worden ist.

Ergebnisse: Auf Fleischextrakt-Pepton-Nährlösung wachsen beide Stämme stark, ohne Ferrimycin abzubauen. Auf der „synthetischen“ Nährlösung ist das Wachstum verlangsamt, das den Kulturen zugefügte Ferrimycin wird aber in der gleichen Weise umgewandelt, wie das für die Ferrimycin-empfindlichen Stämme gezeigt worden ist. Die Ferrimycin-resistenten Bakterienstämme sind auf der „synthetischen“ Nährlösung doppelt geschützt gegen Ferrimycin: einerseits durch die genotypische Resistenz und andererseits durch die auf „synthetischer“ Nährlösung mögliche Ferrimycin-Umwandlung.

Es bleibt noch die Frage zu prüfen, ob die Nährboden-abhängige Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin auch für die anderen Sideromycine gilt, und somit ein weiteres Gruppenmerkmal darstellt, oder ob diese Umwandlung nur auf Ferrimycin beschränkt ist.

Nach BICKEL u. Mitarb. (1960, 1) können die Sideromycine mit Hilfe der Papierchromatographie in drei Gruppen aufgeteilt werden: I. Grisein, Albomycin und A 1787; II. A. 22765; III. Ferrimycine.

Versuche über die Umwandlung von Sideromycinen können nur mit stark angereicherten Präparaten ausgeführt werden. Außer Ferrimycin stand uns bis jetzt nur eine kleine Menge hoch aktives Albomycin zur Verfügung¹.

Analog zu den Versuchen mit Ferrimycin haben wir auch mit Albomycin eine bakterielle Umwandlung versucht. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus megaterium* wurden auf „synthetischer“ Nährlösung angezogen und hernach die Kulturen mit Albomycin versetzt. Albomycin wird durch die hier geprüften Organismen nicht abgebaut, die Aktivität bleibt über die ganze Versuchsdauer im vollen Umfange erhalten und es kann kein Sideramin nachgewiesen werden.

In Plattendiffusionstesten sind *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* auf „synthetischem“ Agar ausgesät empfindlicher gegen Albomycin (Sideromycin-Gruppe I) und A 22765 (Sideromycin-Gruppe II) als auf Fleischextrakt-Pepton-Agar. Auf festen Nährböden konnte bis jetzt keine Nährboden-abhängige Resistenz der geprüften Mikroorganismen gegenüber Albomycin und A 22765 festgestellt werden.

Zusammenfassung

Die Resistenz von Mikroorganismen gegenüber Ferrimycin wird untersucht. Es können drei Formen von Resistenz aufgezeigt werden:

1. Natürlich-genotypische Resistenz: z.B. *Escherichia coli*. Eine ganze natürliche Population ist Ferrimycin-resistent.

¹ Wir danken Herrn Dr. ŠEVČIK, Prag, für die Überlassung von Albomycin.

2. Induziert-genotypische Resistenz: Sie entsteht in einem Schritt und ist genetisch fixiert. Die Resistenzrate beträgt ein resistenter auf 10^4 — 10^5 empfindliche Keime.

3. Ernährungs-bedingte Resistenz. Sie wird verursacht durch eine Ernährungs-bedingte Umwandlung von Ferrimycin in ein Sideramin.

Literatur

- BICKEL, H., E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN u. H. ZÄHNER: *Experientia* (Basel) **16**, 129 (1960, 1).
- BICKEL, H., E. GÄUMANN, G. NUSSBERGER, P. REUSSER, E. VISCHER, W. VOSER, A. WETTSTEIN u. H. ZÄHNER: *Helv. chim. Acta* **43**, 2105 (1960, 2).
- DEMEREZ, M.: *J. Bact.* **56**, 63 (1948).
- GARROD, L. P., and P. M. WATERWORTH: *Brit. med. J.* **1956**, 61.
- GAUSE, G. F., u. M. G. BRAZNIKOVA: *Nov. Med. (Mosk.)* **23**, 35 (1951).
- GILLISSEN, G., u. M. I. GILLISSEN: *Ergebn. Mikrobiol.* **33**, 128—241 (1960).
- REYNOLDS, D. M., A. SCHATZ and S. A. WAKSMAN: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **64**, 50 (1947).
- REYNOLDS, D. M., and S. A. WAKSMAN: *J. Bact.* **55**, 739 (1948).
- SENSI, P., and M. T. TIMBAL: *Antibiot. and Chemother.* **9**, 160 (1959).
- ZÄHNER, H., R. HÜTTER u. E. BACHMANN: *Arch. Mikrobiol.* **36**, 325 (1960).

Soil Microbiology Department, Rothamsted Experimental Station, Harpenden

Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture

By

F. A. SKINNER and N. WALKER

With 7 Figures in the text

(Received October 27, 1960)

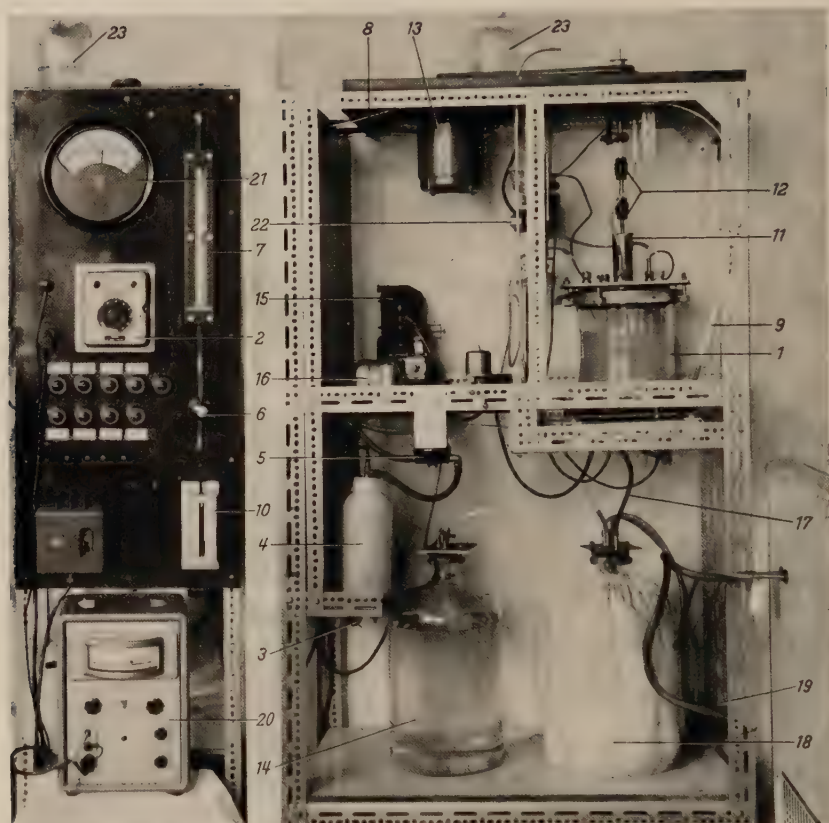
ENGEL and ALEXANDER (1958a) reported the growth of *Nitrosomonas europaea* in a Pyrex glass fermenter, fitted with a stainless steel heating and sparging assembly and using a clear medium, the pH of which was maintained at about 8.0 by the continuous addition of sterile potassium carbonate solution. They pointed out (ENGEL and ALEXANDER 1958b) that the use of culture media containing insoluble constituents would give rise to serious difficulties in metabolic studies because "secondary physical or chemical reactions might obscure physiological transformations". A study of the enzyme system involved in the oxidation of ammonia to nitrous acid would be greatly facilitated if enough active bacteria, free from inorganic impurities, could be obtained.

ENGEL and ALEXANDER showed that their culture contained less than 1% of viable heterotrophic contaminants able to grow on nutrient agar. After 60 hours growth in the logarithmic phase they obtained a culture containing 190×10^6 viable organisms per ml and a yield of 72.4 mg dried organisms per litre.

The purpose of our work was to obtain quantities of *Nitrosomonas* organisms, suitable for metabolic studies, by growth in continuous flow culture in an apparatus equipped to control the pH automatically. A pure culture of *Nitrosomonas europaea* was used. It was necessary to examine the effect of various constituents of the medium, certain metallic ions and stainless steel, on the growth of this micro-organism in flasks as a preliminary to studying the behaviour of *Nitrosomonas* in the culture vessel.

Materials and Methods

Micro-organism. A strain of *Nitrosomonas europaea*, originally obtained from Dr. H. L. JENSEN of Lyngby, Denmark, was given to us by Dr. JANE MEIKLEJOHN. The culture was presumed to be pure because when it was inoculated on to peptone agar and incubated at 30° aerobically for six days, no colonies developed and no abnormal forms were seen under the microscope either in a water mount or in Gram-stained preparations. On one occasion when a culture became contaminated acciden-



Front view

Side view

Fig. 1. (1) Culture vessel made of industrial glass pipeline (Q.V.F. Ltd.). Vessel is closed at each end with a stainless steel plate and a neoprene gasket. Tubes and electrodes enter the vessel through silicone-rubber stoppers inserted into short externally-threaded stainless steel tubes screwed into the closure plates against neoprene bonded seals (Dowty Seals Ltd.). Each stopper is secured in its tube by a threaded metal cap. All stainless steel fittings are of the grade EN 58 B. The vessel is heated electrically by a 75 watt heater element inserted into a stainless steel sheath projecting upwards from the bottom plate. Temperature is controlled by a S. 110, G. Sangamo Weston resistance thermometer in the vessel working with a precision thermostat (2), (Fielden Electronics Ltd.).

The air compressor (MU/19, Type 30, Charles Austen Pumps Ltd.) situated behind the polythene reservoir bottle, draws air through a cotton-wool filter (3) and pumps it to the 2.5 litre polythene bottle (4) which minimises pulsations in the air flow. Air then passes through a flow controller (5), (Sunvic Controls Ltd.), needle valve (6), rotameter (7), air line (8) and a sterile cotton-wool filter (9). Sterile air is admitted to the vessel through a small orifice in the centre of the bottom plate.

(10) Air compressor speed control. (11) Gas-tight bearing (based on a design suggested by M. R. E., Porton). (12) Flexible couplings to impeller shaft. (13) Stirrer motor.

Sterile medium is pumped from the 20 litre reservoir (14) to the culture vessel by a Sigmamotor peristaltic pump (15) driven by a geared motor (16). Effluent from the vessel passes down the overflow pipe (17) to a 20 litre reservoir bottle lagged with a fibreglass jacket (18). Here the effluent is refrigerated by circulation of cold antifreeze solution through a coil of plastic tubing within the reservoir by the pump (19).

(20) pH meter, (21) pH alarm relay. (22) Solenoid valve for controlling admission of alkali to culture vessel, (23) Reservoir for sterile alkali.

tally, it was purified again by first counting the total number of organisms present, then making suitable dilutions and with these inoculating a series of flasks containing clear sterile medium. After about three weeks' incubation at 25°, flasks in which ammonia had nitrified, but from which no contaminants grew on peptone agar, were selected as pure cultures of *Nitrosomonas*. The strain used was a small, non-motile, Gram negative rod.

Media. For experiments in flasks a medium was used which contained the following amounts of analytically pure salts per litre of distilled water: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g; KH_2PO_4 , 0.07 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g. Sterilized sodium carbonate solution (0.4 ml 5% w/v Na_2CO_3) was added aseptically per 100 ml of the above sterilized medium to adjust the pH to about 8.0. (In preliminary experiments it had been found that the amounts of mineral salts could be varied widely without detriment to growth, but the above quantities of calcium chloride and magnesium sulphate were chosen so as to avoid precipitation of insoluble phosphates when the medium was eventually made alkaline.) The above medium contained a trace (ca. 0.1 mg/l) of iron as impurity and so, in experiments where the final bacterial density was not greater than about 400×10^6 organisms/ml, no response to additional iron was detected.

The medium used for experiments in the culture apparatus contained: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0–8.0 g; KH_2PO_4 , 0.4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; and, when necessary, 0.1–0.6 mg Fe (added in the form of an equimolecular mixture of ferrous sulphate and ethylenediamine-tetra-acetic acid); distilled water, 1 litre. Twenty litre batches of this medium were prepared as follows: the required quantities of salts, except the iron, were dissolved separately in small quantities of distilled water and added to about 3 litres of distilled water contained in a 20 l bottle. The bottle was then closed with a stainless steel plate (Fig. 1) carrying entry and exit tubes and autoclaved at 15 lb./sq. in. for 15 minutes. After cooling, sterilized chelated iron solution was added aseptically, when required, and the medium made up to volume with distilled water delivered directly from a sterile condenser. The entry tube was then protected by a sterile cotton wool air filter.

Counting technique. The rate of growth of *Nitrosomonas* was followed by counting the organisms under the microscope, using a haemocytometer slide, 0.05 mm. deep with Thoma ruling. A $20 \times$ fluorite objective with a $10 \times$ or $15 \times$ compensating eyepiece usually gave suitable magnification.

Ammonia estimation. The concentration of ammonia in cultures was estimated by distillation of 2 ml samples, after making alkaline by the addition of a few drops of sodium hydroxide solution (40% w/v), in a Markham (1942) still, collecting the distillate in dilute boric acid solution, followed by titration against standardised N/50 sulphuric acid.

Results

Flask experiments

The clear medium used in these experiments was similar to that described by ENGEL and ALEXANDER (loc. cit.), except that it contained sodium instead of potassium carbonate and neither chelated iron nor indicator were added. In a five litre batch of cultures grown in Erlenmeyer flasks (500 ml flasks with 100 ml medium per flask) on a rotary shaking machine at 27°, 19 mg dried organisms per litre were obtained, the total count being about 200×10^6 organisms per ml. ENGEL and ALEXANDER recorded a yield of 72.4 mg dried organisms per litre for

cultures with a viable cell count of 190×10^6 organisms per ml. A viable count would probably be much lower than a total count, which could explain the discrepancy in these yields.

Effect of calcium and magnesium

Flasks of medium from which either calcium chloride or magnesium sulphate had been omitted were sterilized and varying amounts of either sterilized calcium chloride or magnesium sulphate solution were then

Table 1. *The effect of Magnesium and Calcium on growth of Nitrosomonas europaea in flask culture*

Figures = mg NH_3 per 100 ml culture

Time (days)	mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per 100 ml medium			
	0	1.0	2.0	5.0
1	12.1	12.6	12.2	12.1
2	10.3	10.4	11.1	10.9
3	8.5	9.8	9.0	9.3
4	5.5	6.5	5.9	6.2
5	2.0	3.4	2.3	2.3

	mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ per 100 ml medium			
	0	1.0	2.0	5.0
1	12.4	12.2	12.1	12.1
2	11.7	11.6	11.6	11.2
3	10.1	9.5	9.8	9.1
4	6.8	5.9	6.5	5.5
5	4.1	2.0	3.1	2.4

added aseptically. All flasks received an inoculum of 1 ml of a *Nitrosomonas* culture and were then incubated at 30° . The rate of growth was followed by determining the ammonia concentration at intervals (Table 1). The addition of 1, 2 or 5 mg of either $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ or $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per 100 ml medium respectively did not affect the rate of growth. It should be noted that 0.05 mg of calcium chloride and of magnesium sulphate were present in the inoculum and this may well represent more than the organism's specific requirement of calcium and

magnesium in cultures of the density reached in this experiment. KINGMA BOLTJES (1935) claimed that six times this amount of calcium was necessary for optimal growth.

Effect of potassium phosphate

In a similar experiment varying the concentration of potassium dihydrogen phosphate did not affect the rate of growth of *Nitrosomonas*; therefore there was probably enough phosphate (0.28 mg) in the inoculum to provide for normal growth.

Effect of various metallic ions

Iron. Adding up to 2 ppm of Fe as ferrous sulphate had no effect on the growth of *Nitrosomonas*.

Nickel, Chromium. Adding 0.1 ppm. Ni (as nickel sulphate) or Cr (as chrome alum) had no effect, but more than 0.25 ppm of these metals inhibited growth.

Cobalt, Manganese and Zinc. Adding up to 1 ppm of either Co (as nitrate), Mn (as sulphate) or Zn (as sulphate) had no effect on the rate of growth.

Copper. Inhibiting effects on growth were observed with concentrations of 0.5, 0.2 and 0.1 ppm. Cu in the form of copper sulphate. Fig. 2 shows that growth is completely inhibited by 0.5 ppm. Cu and slightly inhibited by 0.1 ppm.

Effect of stainless steel. A piece of stainless steel of the same grade as that used for the culture vessel closure plates was placed in a

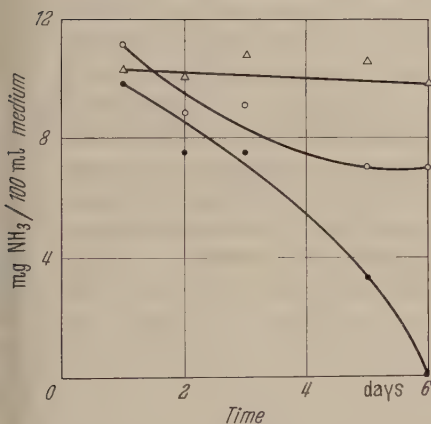


Fig. 2

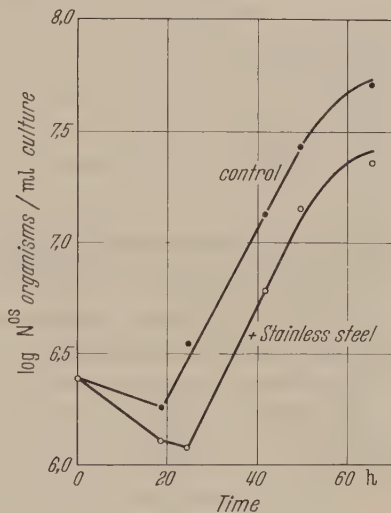


Fig. 3

Fig. 2. Effect of copper on the growth of *Nitrosomonas europaea* in flasks. Fall in NH_3 concentration in cultures containing no copper (●—●), 0.1 ppm copper (○—○) and 0.5 ppm copper (△—△)

Fig. 3. Effect of stainless steel on the growth of *Nitrosomonas europaea* in flasks. Increase in numbers of organisms with time in cultures in the presence of stainless steel (○—○) and its absence (●—●)

flask of medium and sterilized. After sterilization, this flask together with a second control flask without steel, received an inoculum of *Nitrosomonas* to give an initial population of 2.5×10^6 organisms/ml and they were incubated at 30° . Fig. 3 shows the density of population of bacteria, estimated by counting at suitable intervals. During the first 18 hours in the control flask, and the first 24 hours in the flask with the stainless steel part, numbers fell, after which growth followed a logarithmic course for the next 20 or 30 hours until aeration became a limiting factor and the rate of growth declined. During the logarithmic phase the mean doubling time was about 8 hours in both flasks so that the presence of this grade of stainless steel in no way affects the rate of growth of *Nitrosomonas*.

Culture vessel experiments

These experiments were made in a culture vessel similar to that described by ELSWORTH et al. (1956). It consisted of a standard 12 in length of Pyrex glass industrial pipeline, closed at each end by a stainless steel plate (grade EN58 B), into which various unions or thimbles were fitted to make connections to the auxiliary pieces of equipment. Fig. 1 shows this vessel, together with equipment for agitation, supplying sterile air and medium and for maintaining constant temperature and p_H . The p_H control system was as described by CALLOW and PIRT (1956), but instead of a p_H recorder fitted with relay contacts, the output from the direct-reading p_H meter was taken to a p_H Alarm Unit (Electronic Instruments Ltd., Richmond), the relay of which was adjusted to operate whenever the p_H of the culture fell below a predetermined value. This relay actuated a solenoid valve which permitted sterile alkaline solution to flow into the culture vessel until the required p_H value of the culture had been restored. The p_H of the culture could be maintained in this way to within ± 0.1 p_H units of the predetermined value. In experiments to determine optimal conditions for growth, a small vessel (internal diameter 4 inches) was used with a volume of about 1.8 litres of medium. A larger vessel (internal diameter 9 inches) with a volume of 7–8 litres of medium was used to produce organisms continuously.

No difference in growth rate was detected within the range 28–32°; the following experiments were made at 30° and with an impeller speed of about 600 r.p.m. unless otherwise stated.

Growth rate of Nitrosomonas in batch culture

Medium containing 0.5% ammonium sulphate was pumped into the culture vessel, adjusted to p_H 7.4 with 5% aqueous sodium carbonate solution, inoculated with 100 ml of a flask culture of *Nitrosomonas* and the temperature raised to 30°. A few hours later, when the p_H value had fallen slightly indicating that growth had started, a sample was removed and the organisms counted. The culture was allowed to grow for the next five days and from time to time the organisms in samples were counted. Fig. 4 (curve A) shows that logarithmic growth occurred during the 3rd and 4th days and that the population reached the maximum of 520×10^6 organisms per ml during the 5th day, after which it decreased slightly.

Effect of iron

An experiment was made in which chelated iron was added to the medium at a concentration of 0.5 ppm and the culture was maintained in the p_H range 7.0–7.4. Fig. 4 (curve B) shows the numbers of organisms and the concentration of ammonia at intervals. The population density rose from 56×10^6 organisms/ml to 910×10^6 organisms/ml in less than

4 days, after which a slight fall in numbers was again noticed. The doubling time during the logarithmic phase was about 16 hours.

In two other experiments in which 0.5 and 0.6 ppm. Fe respectively were added to the medium, the total number of bacteria per ml increased to 740×10^6 and 850×10^6 organisms/ml. Thus, in our medium, iron apparently becomes a limiting factor for the growth of *Nitrosomonas* only after a population density of about 500×10^6 organisms/ml has been reached.

Growth of Nitrosomonas in continuous culture

In these experiments the procedure adopted was to grow the organism as a batch culture until either the desired density of cell population was attained or the ammonia was consumed. A continuous flow of medium was then started and the effect of

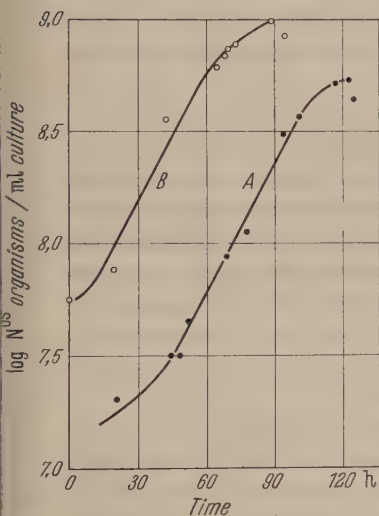


Fig. 4

Fig. 4. Effect of iron on the growth of *Nitrosomonas europaea* in batch culture. Increase in numbers of organisms with time in cultures. Curve A control culture without iron. Curve B culture with 0.5 ppm Fe

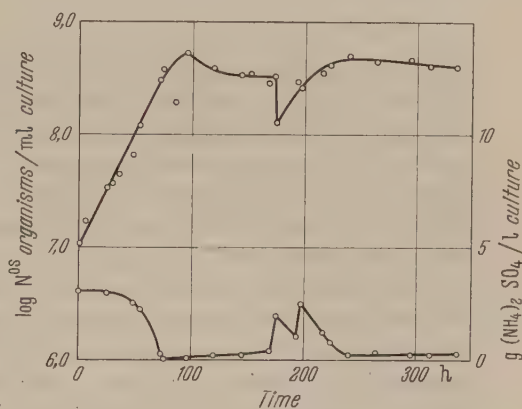


Fig. 5

Fig. 5. Growth of *Nitrosomonas europaea* in continuous culture. Upper curve shows variation in numbers of organisms with time. Lower curve shows variations in the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with time

various flow rates on cell population density and substrate (i. e. ammonia) concentration determined.

Experiment using a 4 inch diameter culture vessel

During the initial stage of this experiment the bacterial population increased from 11×10^6 organisms/ml to 371×10^6 organisms/ml in 74 hours (Fig. 5); the mean doubling time was about 16 hours, as observed previously, and the ammonia concentration fell to a low level. A continuous flow of medium at about 30 ml/hour was then started and

maintained for the next three days; during this time the bacterial count remained fairly steady but the concentration of ammonia increased very slowly although it still remained low. The culture was next diluted with fresh medium until the bacterial population was brought to 125×10^6 organisms/ml and growth was allowed to continue batchwise until a population of 493×10^6 organisms/ml was reached. The continuous slow flow of medium was then restored for the next three days. During this second continuous culture phase, steady conditions similar to those just described for the first were attained. In this experiment when 30 ml per hour of medium flowed into a total volume of 1800 ml of culture, the dilution rate was 0.016 vol/hour and the mean residence time of the cells 60 hours. Higher dilution rates invariably caused the culture to "wash out" which suggested that under conditions of continuous flow and for unexplained reasons the doubling time was much longer than 16 hours, the value found under batch conditions.

Experiments using different ammonium sulphate concentrations

In the first of these experiments, the medium contained 0.5 g ammonium sulphate per litre. The culture was started batchwise in the usual way and when the population had reached 60×10^6 organisms/ml, medium was introduced continuously at about 30 ml/hour. The numbers of bacteria and concentration of ammonium sulphate were determined at intervals. A steady state became established after some days at a bacterial population density of about 30×10^6 organisms/ml and an ammonium sulphate concentration of 0.05 g/litre.

A new supply of medium containing 1 g ammonium sulphate/litre was then substituted. The bacterial population in the culture was increased somewhat by growth for a time under batch conditions, when a continuous feed of this new medium at 30 ml/hour was started. After some days a new steady state became established with bacterial numbers constant at about 120×10^6 /ml and the ammonium sulphate concentration was slightly more than 0.2 g/litre. By increasing the rate of flow of medium to 78 ml/hour, a new steady state was eventually established with the ammonium sulphate concentration at 0.61 g/litre and the density of the bacterial population at about 40×10^6 /ml. These rather unsatisfactory results suggested that some other factor must be limiting the growth rate.

Growth of Nitrosomonas in continuous culture with improved aeration

The effect of increased aeration on the growth of *Nitrosomonas* in continuous culture was examined. Agitator speed was increased to 1250 r.p.m. and an air flow rate of 1 litre air per minute was used. *Nitrosomonas* was grown as a batch culture in the large vessel (internal

diameter 9 inches) at 29° using medium containing 6 g ammonium sulphate per litre until all the ammonia had been consumed. Fresh sterile medium was then pumped continuously into the culture vessel at a rate of 250 ml/hour so that the ammonium sulphate concentration in the culture remained below 0.1 g/litre. Overflowing culture was collected in a reservoir bottle cooled to below 10°C. Fig. 6 shows the concentration of ammonia and bacterial numbers in samples taken at different times. After 5 days, 30 litres of culture were obtained containing about 600×10^6 organisms/ml; this afforded 2.14 g (dry weight) of bacteria.

When medium containing 8 g/litre ammonium sulphate was used, with a similar medium flow rate and aeration conditions, cultures were produced containing about 800×10^6 organisms/ml.

Extraction of a Cytochrome pigment from *Nitrosomonas* cells

Nitrosomonas cells, separated by centrifuging, were obtained as a brick-red coloured paste in which a cytochrome C-like pigment was detected by examination with a hand spectroscope. An attempt was made to isolate this substance. A thick paste of *Nitrosomonas* cells (about 1 g dry weight) was frozen and allowed to thaw alternately several times until a deep red liquid could be separated on centrifuging. The mass of partially disrupted cells was well mixed with cold dilute aqueous ammonia (20 ml 1%) and centrifuged at 2500 r.p.m. for 15 minutes. Solid ammonium sulphate was added to the supernatant liquid to give an approximately 15% solution. This liquid was centrifuged again to remove a pale coloured precipitate, and then the pigment was precipitated by adding trichloroacetic acid solution (0.1 volumes of 25%).

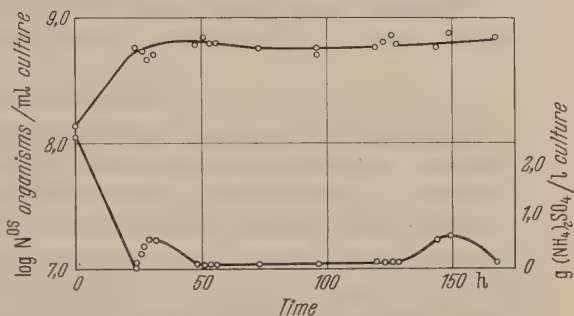


Fig. 6. Growth of *Nitrosomonas europaea* in continuous culture with improved aeration. Upper curve shows variations in numbers of organisms with time. Lower curve shows variations in the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with time

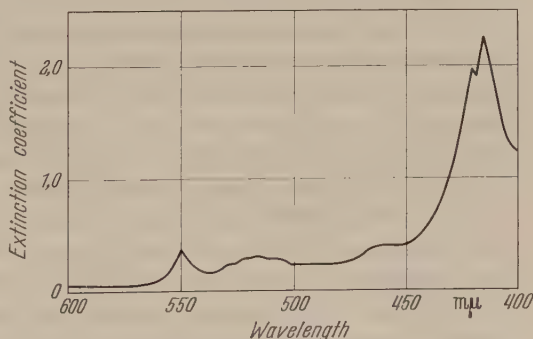


Fig. 7. Absorption spectrum of impure cytochrome C preparation from *Nitrosomonas europaea*

This coloured precipitate (0.23 g) was dialysed against distilled water to remove any trichloroacetic acid and then dried in a desiccator in vacuo at room temperature. The absorption spectrum of this crude preparation was determined by dissolving a suitable quantity in very dilute aqueous ammonia to which sodium hydrosulphite was added to reduce the cytochrome. Fig. 7 shows the absorption curve in which three main maxima may be easily recognised corresponding to an α band at 550 $m\mu$, a β band at 516–517 $m\mu$ and a γ band at 415 $m\mu$.

Discussion

Satisfactory growth of *Nitrosomonas* in the culture vessels was not achieved in the earlier experiments for various reasons. Some batch cultures were characterised by slow initial growth, or failure to grow at all after one or two days, or a turbidity denser than was consistent with the small population of micro-organisms. In these cultures the stirrer shaft and impeller became corroded at the places where the blades had been welded to the disc. The corrosion of the shaft happened because an unsuitable grade of stainless steel had been used instead of the specified grade EN58B, and did not happen when a shaft of the latter grade of steel was substituted. The impeller, however, was made from the correct grade of stainless steel but heat treatment of the metal during welding had impaired its resistance to corrosion by the alkaline mineral salt medium. Traces of nickel or chromium may have been released from the corroded areas of the stainless steel and both these metals at concentrations greater than 0.25 ppm inhibit growth of *Nitrosomonas*. The fitting of a new impeller having blades secured to the disc by friction fit prevented corrosion.

After these modifications to the culture vessel, the micro-organism grew satisfactorily during the early stages of a culture when the population was small. In the logarithmic phase, doubling times of the order of 11–16 hours were frequently achieved, at least until the bacterial population exceeded about 300×10^6 organisms/ml. After this, growth proceeded more slowly with apparent doubling times (i.e. assuming no autolysis of old cells) of 2 or 3 days. Bacterial populations of about 900×10^6 organisms/ml were occasionally reached but only after running the culture for several days. Adding small volumes of concentrated solutions of ammonium sulphate and other constituents of the medium to such slowly growing cultures had no effect, showing that the slow growth was not due to nutrient deficiency. Later experiments with continuous cultures showed that aeration was a limiting factor for growth.

Before the importance of aeration was realised, attention was focused on cultures growing actively in the logarithmic phase and attempts made to run these continuously by adding medium at dilution rates corresponding to a 16 hour doubling time. Invariably these cultures 'washed out'.

Only by feeding in medium at the low rate of 27 ml/hour (the slowest feed rate of which the pump was capable), could cultures be maintained. Under these conditions populations were kept fairly constant, generally well below 400×10^6 organisms/ml, with concentrations of ammonia which at all times were low but which tended to rise slowly during the 3 or 4 days the experiments lasted. Though an apparently steady state was reached, it could not be regarded as a true steady state, because the doubling time was much longer than in batch cultures and could not be decreased by increasing the dilution rate. The number of cells in such cultures was never adequate for metabolic studies. Eventually we succeeded in obtaining higher bacterial populations, with satisfactory doubling times, in batch cultures and in maintaining these in continuous culture with higher dilution rates by increasing the impeller speed and so improving aeration efficiency. From this it is clear that in many earlier experiments growth was limited by inadequate aeration. More detailed study of the conditions affecting growth in such culture vessels may lead to further improvements in the rate of growth of *Nitrosomonas* and in the yield of organisms.

Summary

A clear medium has been used to grow pure cultures of *Nitrosomonas europaea* in flasks and in a continuous culture apparatus.

Of several metallic ions examined in flask cultures of *Nitrosomonas*, Fe at 2 ppm and Co, Mn and Zn at 1 ppm were not toxic, Ni and Cr at concentrations greater than 0.25 ppm inhibited growth and Cu stopped growth completely at 0.5 ppm and inhibited at 0.1 ppm. Stainless steel of the specification EN58B did not affect growth.

In the continuous culture vessel, *Nitrosomonas* showed a growth response to Fe only when the population exceeded about 500×10^6 organisms/ml. The minimum doubling time was about 8 hours in flasks and 11 hours in the culture vessel. With effective aeration and automatic pH control, cultures of *Nitrosomonas* were grown successfully in continuous culture and gave a yield of 2.14 g dry weight of bacteria from 30 litres of culture in 5 days.

We are grateful to Mr. J. M. BROOKS for skilled technical assistance, to Dr. N. PFENNIG for help with certain experiments and to Dr. D. HERBERT for useful advice.

References

- CALLOW, D. S., and S. J. PIRT: *J. gen. Microbiol.* **14**, 661 (1956).
ELSWORTH, R., L. R. P. MEAKIN, S. J. PIRT, and G. H. CAPELL: *J. appl. Bact.* **19**, 264 (1956).
ENGEL, M. S., and M. ALEXANDER: *J. Bact.* **76**, 217 (1958a).
ENGEL, M. S., and M. ALEXANDER: *Nature (Lond.)* **181**, 136 (1958b).
KINGMA BOLTJES, T. Y.: *Arch. Mikrobiol.* **6**, 79 (1935).
MARKHAM, R.: *Biochem. J.* **36**, 790 (1942).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

Über den Stoffwechsel und die Cellulosesynthese von *Acetobacter xylinum* (Brown) Holland *

Von

JOSEF WEIGL

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 2. November 1960)

Acetobacter xylinum wurde 1886 von A. J. BROWN entdeckt. Die extracellulären Membranen, die dieses Bakterium auf Kohlenhydratmedien bildete, zeigten dieselben Eigenschaften wie Baumwolle [Löslichkeit in ammoniakalischem Kupferhydroxyd, dem von SCHWEIZER (1857) gefundenen Reagens; Auftreten von reduzierenden Zuckern bei der Hydrolyse]. Daß es sich bei dem Membranmaterial um echte Cellulose handelt, ging aus den Untersuchungen von VAN WISSELINGH (1917) und HIBBERT (1930) hervor. Die physikalischen Methoden der Röntgen-Strukturanalyse und Elektronenmikroskopie ermöglichten in der Folgezeit eine intensive Celluloseforschung und sicherten die Identität pflanzlicher und bakterieller Cellulose vollends: MARK u. v. SUSICH (1929) erhielten bei Baumwolle und Cellulose bakterieller Herkunft dieselben Röntgendiagramme; HERMANS u. WEIDINGER (1949) bestimmten die Kristallinität mit 40%, einem Wert, der dem der Primärwandcellulose ungefähr gleichkommt (FREY-WYSSLING 1954); Untersuchungen von KAUSHAL u. WALKER (1947) und elektronenmikroskopische Arbeiten von FREY-WYSSLING u. MÜHLETHALER (1946) sowie MÜHLETHALER (1948 und 1949) brachten die Erkenntnis, daß die Bakterien-cellulose aus Fibrillen besteht, die annähernd die gleichen Breitendimensionen aufweisen (250 Å) wie die von MÜHLETHALER (1949) vermessenen Fasern aus Zellwänden höherer Pflanzen. [Am Rande erwähnt sei, daß nach FREY-WYSSLING u. FREY (1950), MEYER, HUBER u. KELLENBERGER (1951) sowie RANBY (1952) die Tunicatencellulose ganz entsprechend gebaut ist.] Infrarotspektroanalysen von BARCLAY u. Mitarb. (1954) an Cellulose von *Acetobacter acetigenum* ergaben zudem einen Polymerisationsgrad von 600 β -Glucose-Einheiten, einen Wert, der denjenigen nativer α -Cellulose (STAUDINGER 1937) erreicht.

* Teil 1 einer Dissertation der Fakultät für Chemie, Biologie, Geologie und Mineralogie der Technischen Hochschule Darmstadt.

Dieser eingehenden Kenntnis der Biophysik und Chemie der Cellulose stand bis vor einem Jahrzehnt die Unkenntnis der biochemischen Umsetzungen der Cellulose und des allgemeinen Stoffwechsels jenes Bakteriums gegenüber, das sich als das wichtigste Werkzeug beim Studium der Cellulosesynthese erweisen sollte. Erst in den letzten Jahren wurden auch auf diesem Gebiet wesentliche Fortschritte erzielt, auf die wir noch eingehen werden.

Material und Methoden

I. Kultur des Bakteriums: Zu den Versuchen wurden Kulturen und Enzympräparate von *Acetobacter xylinum* (Brown) Holland (American Type Culture Collection 10245) verwendet. Es war nötig, ein synthetisches Nährmedium anzustreben, da die bisher übliche Verwendung von Hefeeextrakt die Isolierung stoffwechseleigener Substanzen in Frage stellte oder eine Kultur auf radioaktiven Kohlenhydraten erforderte. Da sich das Bakterium als p-Aminobenzoesäurebedürftig erwiesen hat (ZIEGLER u. WEIGL 1959), wurde vorwiegend folgende Nährlösung verwendet: H_2O dest. 1000 ml; KH_2PO_4 0,7 g; Na_2HPO_4 0,3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; CaCl_2 sicc. 0,1 g; NH_4NO_3 1,0 g; FeCl_3 10% Lösung, 1 Tropfen; Hoaglands A—Z Lsg. 1 ml; p-Aminobenzoesäure 100 γ ; Äthanol 10 ml; Kohlenhydrat (meist Glucose) bis 40 g. Änderungen werden jeweils angegeben. Normalerweise wurde das Medium ohne Agarzusatz verwendet und bei 120°C und 1,5 kg/cm² 15 min sterilisiert; hitzeempfindliche Substanzen (Vitamine, Phosphorsäureester, Disaccharide etc.) wurden mit einem Membranfilter keimfrei gemacht. Die Chinhydron-Elektrode zeigte vor und nach dem Sterilisieren einen pH -Wert von 5,7 an.

II. Gewinnung von Enzympräparaten: Zur Herstellung zellfreier Enzympräparate wurde der Bakterienерtrag von Flüssigkeitskulturen im Stadium hoher Syntheseaktivität geerntet und in einem Starmix bei 5°C 30 sec gerührt, wobei die Cellulosemembranen ausgiebig zerschlagen wurden. Aus dieser Suspension wurde nach der Methode von HESTIN u. SCHRAMM (1954) die Cellulose weitgehend entfernt und die Zellen durch Gefriertrocknen in einer Gefrierzentrifuge (Speedivac, Edwards High Vacuum Ltd.) als hygroskopisches Pulver erhalten, welches mit drei Volumteilen Puffer (der von Fall zu Fall verschieden sein konnte und bei den einzelnen Versuchen angegeben wird) aufgenommen, in einer Vibrogen-Zellmühle 10–20 min unter Kühlung auf 5°C gemahlen und bei 16000 g zentrifugiert wurde. Das Überstehende wurde mit den Reaktionsgemischen inkubiert.

III. Präparation von Cellooligosacchariden und Cellodextrinen: a) Die Hydrolyse von 500 g Cellulose wurde nach den Angaben von ZECHMEISTER u. TOTH (1931) mit konzentrierter Salzsäure ausgeführt, die nach der Hydrolyseprozedur mit Eis verdünnt und mit gekühlter, konzentrierter Natronlauge langsam neutralisiert wurde. Die neutrale Brühe wurde unter kräftigem Nachwaschen filtriert. Ein Drittel des Filtrats wurde nach ZECHMEISTER u. TOTH zu Cellodextrinen und Cellohexaose aufgearbeitet; die übrigen zwei Drittel wurden von einem 3 m erhöhten Reservoir aus durch eine Kohlesäule (6 × 30 cm, WHISTLER u. DURSO 1950) geschickt. Die Chlorionen wurden mit 7 l H_2O , die Glucose und Cellobiose mit 5 l 7,5%igem Äthanol restlos eluiert. Mit weiteren 2,5 l 15%igem Äthanol gelang es, die Hauptmenge der Cellotriose frei von Cellobiose und Cellotetraose abzutrennen. Der folgende Liter 15%iger Alkohol enthielt nur noch Spuren von Cellotriose. Die Cellotetraose erschien dann in 2,5 l 20%igem Alkohol frei von Cellotriose und höheren Oligosacchariden. Die auslaufenden Fraktionen wurden papierchromatographisch auf Zucker getestet (siehe unten). Eine Ausdehnung dieser Methode auf die folgenden Oligosaccharide bereitete Schwierigkeiten: die spezifische Desorptionswirkung

bestimmter Alkoholkonzentrationen verschlechterte sich, so daß beim Eluieren keine zuckerfreien Übergänge mehr festzustellen waren. Bereits 2 l 30%iger Alkohol eluierten beträchtliche Mengen höherpolymerer Oligosaccharide.

b) Die soeben beschriebene Präparation der Oligosaccharide läßt sich in ein wesentlich eleganteres Verfahren abwandeln: Die nach der Hydrolyse der Cellulose vorliegende salzsaure Lösung wird nach Verdünnen auf das zehnfache Volumen über Nacht stehengelassen, filtriert und mit einem schwach basischen Ionenaustauscher (Amberlite IR 45, 20–50 mesh) neutralisiert. Die neutrale Zuckerlösung wird bei 45°C unter vermindertem Druck eingetrocknet. 5 g des auf diese Weise gewonnenen Materials werden in 100 ml 8%igem Äthanol gelöst bzw. suspendiert und auf eine Kohlesäule (6 × 17 cm) gegossen. Glucose und Cellobiose werden mit 3 l 8%igem Alkohol restlos ausgewaschen. Die höherpolymeren Zucker werden durch eine kontinuierlich steigende Alkoholkonzentration eluiert: In einem 3 m erhöhten Auslaufgefäß werden 1,5 l 12%iger Alkohol vorgegeben und magnetisch gerührt. Durch das Ausfließen wird aus einem zweiten Reservoir 40%iger Alkohol nachgezogen. Es

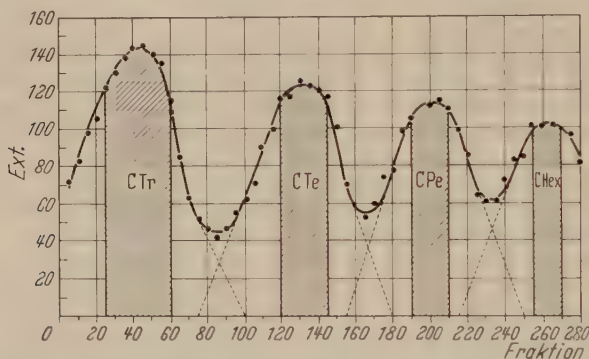


Abb. 1. Säulenchromatographische Trennung der Oligosaccharide aus einem Cellulosehydrolysat. Beschreibung im Text

passierten etwa 5,5 l Flüssigkeit die Kohlesäule mit einer Geschwindigkeit von 20 ml je 30 min. Das Ausfließende wird mittels eines Fraktionenkollektors in 20 ml-Fractionen aufgefangen. Aus jeder fünften Fraktion wird eine 0,1 ml-Probe der Zuckerbestimmung nach WALLENFELS (aus PAECH u. TRACEY 1955) zugeführt. Die Ordinate in Abb. 1 zeigt die gemessene Extinktion bei 405 m μ , die Abszisse die Zahl der Fraktionen. Die äußerste Streuung von Spuren der einzelnen Zucker wurde chromatographisch ermittelt (punktierte Linien). Die den schraffierten Gebieten entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt; die darin enthaltenen Zucker waren frei von den angrenzenden Homologen.

c) Präparation radioaktiver Cellulose und der bei ihrer Hydrolyse anfallenden Zucker: Zu 2 ml der oben angegebenen Nährlösung (1,5% Glucose) wurden steril 2% ATP, 10% durch Gefriertrocknen gewonnenes Bakterienpulver, 1% Hefeextrakt und 0,2 mc uniform markierter Glucose gegeben. Die im Laufe von 24 Std gebildete Cellulose wurde durch Zentrifugieren geerntet und gereinigt wie unter VI. angegeben ist. Sodann wurde die Cellulose 5 Std bei Zimmertemperatur mit 1 ml konz. Salzsäure geschüttelt, mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und über Nacht bei 2°C stehengelassen. Die ausgefallene Cellulose wurde durch Zentrifugieren gewonnen und gewaschen. Das Überstehende wurde mit Amberlite-Ionenaustauscher IR 45, 20–50 mesh, neutralisiert, durch Gefriertrocknen auf 1 ml eingengt und

durch Einstellen einer Alkoholkonzentration von 27% (20°C, 5 Std) die Cello-dextrine gefällt. Die Oligosaccharide wurden durch Papierchromatographie getrennt. Es wurde mehrmals aufsteigend in Butanol-Dimethylformamid-Wasser (2:1:1) chromatographiert. Nach fünf Aufstiegen konnten Glucose, Cellobiose, Cellotriose, Cellotetraose und Cellopentaose als radioaktive Bänder lokalisiert und eluiert werden. Die am Startstrich zurückgebliebenen Zucker wurden mit 10 ml Wasser durch einstündiges Kochen im Rückflußkühler extrahiert, eingeengt und erneut im gleichen Lösungsmittel 15 Tage absteigend chromatographiert. Es konnten noch Cellohexaose, Celloheptaose und die am Startstrich bleibenden Zucker abgetrennt werden. Bei der Salzsäurehydrolyse der Cellulose treten auch andere, unbekannte Produkte auf, die auf Verunreinigungen zurückzuführen sind oder durch komplexe Vorgänge bei der Hydrolyse entstehen. Sie sind aber nur in sehr geringer Menge vorhanden und chromatographisch gut von den gesuchten Zuckern zu unterscheiden, stören somit die Isolierung der letzteren nicht.

IV. Präparation von Maltotriose: 20 g käufliches Amylodextrin (Merck) wurden in 500 ml m/50 Phosphatpuffer pH 7,2 mit 10 ml filtrierten Speichels 5 Std bei 30°C aufbewahrt. Die Reaktion wurde durch kurzes Aufkochen abgebrochen. Nach nur einstündiger Einwirkung des Speichels liegen auch die höheren Amylo-oligosaccharide in präparativ gewinnbaren Mengen vor. Die Trennungsmöglichkeiten sind denen der Celooligosaccharidreihe analog (WHISTLER u. DURSO 1950).

V. Darstellung von Uridindiphosphatglucose: Uridindiphosphatglucose (UDPG) und verwandte Verbindungen wurden nach einer Vorschrift von LEOIR u. PALADINI, die aus COLOWICK u. KAPLAN (1957) entnommen wurde, präpariert (siehe auch CAPUTTO u. Mitarb. 1950; PALADINI u. LEOIR 1952).

VI. Quantitative Cellulosebestimmung: 1. Reinigung: Die bei Kultur- und in vitro-Versuchen anfallende Cellulose wurde 10 min in 4%iger Natronlauge gekocht (JERMYN 1949; COLVIN 1957), zweimal mit heißem, dest. Wasser und zweimal mit 80%igem Äthanol gewaschen und abzentrifugiert. Das resultierende Celluloseprodukt konnte als „rein“ angesprochen werden, da bei seiner Hydrolyse außer Glucose kein anderer Zucker, keine Uronsäuren und keine Aminosäuren papierchromatographisch erfaßt werden konnten. (Bei der Hydrolyse radioaktiver Cellulose sind in sehr geringer Menge auch andere, unbekannte Substanzen durch ihre Strahlung nachweisbar; siehe IIIc.)

2. Bestimmung: Größere Cellulosemengen wurden nach 24stündigem Aufenthalt in einem Vakuumexsiccator, der mit Phosphorpentoxid beschickt war, gravimetrisch bestimmt. Cellulosemengen unter 10 mg wurden nach folgender Arbeitsweise ermittelt: Die gemäß obiger Beschreibung vorgereinigte und abzentrifugierte Cellulose wurde mit 1 ml 5 n HCl aufgenommen und 5 min in einem Wasserbad von 100°C hydrolysiert, nach genau 5 min in ein Eisbad gebracht und mit ungefähr 3 ml eiskaltem, dest. Wasser verdünnt. Mit kalter Natronlauge (etwa 2,5 ml 2 n oder einer äquivalenten Menge anderer Konzentration) wurde neutralisiert und mit dest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt; davon wurden je nach Konzentration 0,1 bis 1 ml einer Zuckerbestimmung nach WALLENFELS unterworfen. Die Eichwerte wurden dadurch gewonnen, daß wägbare Cellulosemengen in salzsaure Lösung gebracht und hydrolysiert wurden, z. B. 100 mg in 100 ml 5 n HCl, und davon definierte Anteile obiger Prozedur (Neutralisation und Zuckerbestimmung) zugeführt wurden. Die Vollständigkeit der Hydrolyse konnte durch Vergleich mit Glucosewerten geprüft werden. Die Methode erlaubt die Erfassung von Cellulosemengen über 50 γ. Bei Neutralisation der mit Eiswasser versetzten salzsauren Lösung mit Amberlite IR 45 (20–50 mesh) ist die Verdünnung durch Gefriertrocknen rückgängig zu machen. Dadurch wird die Bestimmung bis zu 5 γ Cellulose möglich.

VII. Phosphatbestimmung: Die Beschreibung findet sich im Begleitheft zum Eppendorf-Photometer (siehe auch T. THEORELL 1931; K. C. SCHEEL 1936). Die Lösung wurde in manchen Fällen einer Barium-Fraktionierung unterworfen (vgl. LE PAGE u. UMBREIT 1943).

VIII. Papierchromatographie:

Zucker. Die in unreiner Lösung vorhandenen Kohlenhydrate wurden durch aufeinanderfolgende Behandlung mit einem basischen und sauren Austauschharz (Amberlite IR 45, 20—50 mesh; IR 50, 20—50 mesh) ihrer Ionen entledigt und — da auch Oligosaccharide erfaßt werden sollten — mit dem Laufmittel n-Butanol/Pyridin/Wasser, 6:4:3 (v:v:v) (CHARGAFF u. Mitarb. 1948), chromatographiert. Bei einer Temperatur von 40°C konnten — den Erfahrungen von HOUGH u. Mitarb. (1950) entsprechend — erhöhte Laufgeschwindigkeiten erzielt werden. Aufsteigende Chromatographie erlaubt bei Zimmertemperatur die Trennung der Oligosaccharide. Durch 10—12 Aufstiege über je 24 Std (nach jedem Aufstieg ist das Papier zu trocknen!) sind die Oligosaccharide bis zur Celloheptaose zu trennen. Ein angenehmeres Laufmittel als das eben erwähnte pyridinhaltige hat die Zusammensetzung: n-Butanol/Dimethylformamid/Wasser, 2:1:1 (v:v:v). Die Sprühreagentien wurden den einschlägigen Darstellungen von LINSKENS (1955) und CRAMER (1958) entnommen: Reduzierende Kohlenhydrate wurden mit ammoniakalischem Silbernitrat oder mit Anilinphthalat, nichtreduzierende und oligomere mit Benzidin/Trichloressigsäure nachgewiesen.

Nucleotide und Nucleotidphosphate. Zur Chromatographie dieser Stoffgruppe wurde das Verfahren von PALADINI u. LELOIR (1952) herangezogen.

Zucker-Phosphorsäure-Ester. Die chromatographische Analyse dieser Verbindungsklasse wurde von HANES u. ISHERWOOD (1949) ausgearbeitet; als Laufmittel dient das Gemisch n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser, 6:3:1 (v:v:v), als Sprühreagens wird eine Ammoniummolybdatlösung verwendet (siehe auch LINSKENS 1955). Die Reduktion zu Molybdänblau haben wir nicht in einer Schwefelwasserstoff-Kammer ausgeführt, sondern durch Nachbesprühen des Chromatogramms mit einer 0,1%igen wäßrigen Metol-(p-Methylaminophenolsulfat)-Lösung. Das Sprühreagens ist bei Zusatz von 10% Kaliumpyrosulfit 4 Wochen haltbar.

IX. Die Autoradiographien wurden durch Exponieren mit Agfa-Röntgenfilm ausgeführt. Quantitative Messungen der Strahlungsaktivität von Versuchsgut wurden mit dem F u. H-Zähler 49 vorgenommen. Die Höhe der Aktivität wird in Impulsen je Minute (IPM) ausgedrückt.

Versuchsergebnisse

I. Vitaminbedarf des Bakteriums

Es hat sich ergeben, daß *Acetobacter xylinum* streng p-Aminobenzoensäure-abhängig ist. Der Trockengewichtsertrag ist im Bereich von 0—0,5γ p-Aminobenzoensäure/100 ml proportional der Wirkstoffkonzentration, was die Verwendung als Testorganismus für p-Aminobenzoensäure ermöglicht (ZIEGLER u. WEIGL 1959). Auch andere für den Stoffwechsel wichtige Vitamine zeigen eine gewisse wachstumsfördernde Wirkung: Zusätzliche Gaben bedingen Wachstumssteigerung, aber nur dann, wenn p-Aminobenzoensäure in optimaler Konzentration vorliegt. Suboptimale Konzentrationen an p-Aminobenzoensäure wirken streng limitierend auf das Wachstum des Bakteriums (Tab. 1). Bei gänzlicher Abwesenheit von p-Aminobenzoensäure kommt das Wachstum vollends zum Erliegen.

PURKO, NELSON u. WOOD (1953, 1954) berichten von ernährungs-mäßiger Gleichwertigkeit von p-Aminobenzoessäure und Pantothensäure bei *Bacterium linens*: das Bakterium benötigt zum Wachstum entweder p-Aminobenzoessäure oder Pantothenat; es konnte gezeigt werden, daß p-Aminobenzoessäure eine Rolle bei der Pantothenatsynthese spielt. Da RAINBOW u. MITSON (1953) auch bei *Acetobacter*-Arten (*Acetobacter capsulatum*, *gluconicum*, *turbidans* und *viscosum*) Bedarf an p-Amino-benzoessäure und Pantothensäure nachweisen konnten, wobei der Bedarf an p-Aminobenzoessäure we-niger ausgeprägt ist als der an Pantothensäure, und da Pan-tothensäure auf das Wachstum von *Acetobacter suboxydans* anregend wirkt (KING u. CHEL-DELIN 1953), muß hervorge-hoben werden, daß sich *Aceto-bacter xylinum* in dieser Hin-sicht deutlich abweichend verhält. Der p-Aminobenzoe-säure-Bedarf dieser Art ist durch Pantothensäure nicht zu beseitigen. Die Erscheinung, daß bei Anwesenheit von p-Aminobenzoessäure in opti-maler Menge eine zusätzliche Gabe von Pantothensäure eine weitere Stimulierung des Wachstums hervorruft, ist auf Grund der wichtigen Funktion des Coenzym A, zu dessen Bausteinen die Pantothensäure zählt, verständ-lich. Eine ähnliche Wachstumsförderung bedingen in mehr oder minder deutlicher Weise auch die übrigen geprüften Vitamine (Tab.1).

Die Weiterführung dieser Versuche erbrachte indes das Ergebnis, daß die p-Aminobenzoessäure offensichtlich bei der Synthese der Folsäure für *Acetobacter xylinum* von Bedeutung ist, wobei sie vermutlich nach dem von KATUNUMA u. Mitarb. (1957) aufgezeigten Mechanismus als Bau-stein in die Folsäure eingeht. Die Folsäure vermag nämlich die p-Amino-benzoessäure im Nährmedium voll zu vertreten und die Toxizität von Sulfanilamid zu beseitigen (siehe Tab.2).

Die Folsäure wiederum ist als Intermediärprodukt auf dem Weg zur 5-Formyl-5,6,7,8,-tetrahydropteroylglutaminsäure anzusehen, welche nach GREENBERG, JAENICKE u. SILVERMANN (1954, 1955) den Formyl-donator bei der Purinsynthese darstellt. Da bei anderen Objekten die Bedeutung der p-Aminobenzoessäure bzw. der Folsäure für den Stoff-

Tabelle 1. Mittelwerte der im Laufe von 10 Tagen herangewachsenen Bakterienmassen (Trockengewichte). Beeinflussung des Ertrages durch Vitaminzusatz bei Kultur auf (a) optimal und (b) suboptimal mit p-Aminobenzoessäure (PABS) versehener Nährlösung (je 100 ml) 27°C

zusätzlich zu PABS gegebenes Vitamin (je 10 γ /100 ml)	a) 10 γ PABS/100ml mg	b) 0,1 γ PABS/100ml mg
ohne weiteren Vitaminzusatz	40,1	6,42
Nicotinsäureamid	46,3	6,41
Lactoflavin	42,5	6,42
Aneurin	43,2	6,32
Pyridoxin	42,8	6,40
Pantothensäure	49,3	6,45
β -Alanin	40,4	6,44
Biotin	41,0	6,38
gemeinsamer Zusatz	54,4	6,51

wechsel der Einkohlenstoff-Fragmente durch Befunde bekräftigt wurde, wonach diese Säuren durch gewisse, am C_1 -Stoffwechsel beteiligte Aminosäuren (unter anderem Methionin und Serin) und durch Purine, die Endprodukte dieses Stoffwechsels, ersetzt werden können (vgl. z. B. STREHLER 1950; GOTS u. CHU EILEEN 1952), und da außerdem Fälle bekannt sind, bei denen die genannten Substanzen die Sulfanilamid-Hemmung zu beseitigen vermögen (SIVA SANKUR 1958), wurde auch bei *Acetobacter xylinum* nach einer analogen Verhaltensweise gesucht. Es zeigte sich, daß

Tabelle 2

Sulfanilamid-Hemmung des Wachstums von Acetobacter xylinum und deren Beeinflussung durch verschiedene, zum C_1 -Stoffwechsel in Beziehung stehende Substanzen

In 1 l enthaltene Wirkstoffmenge	Trockengewicht Mittelwert aus 6 Einzelwerten mg	Trockengewicht bei Zusatz von 10 γ Vitamin-B ₁₂ /l mg
10 γ PABS	38,7	39,2
10 γ Folsäure	40,2	40,3
10 γ PABS; 5 mg Sulfanilamid	18,2	18,2
10 γ PABS; 5 mg Sulf., 10 γ Folsäure	34,7	35,0
10 γ PABS; 5 mg Sulf.; je 10 mg Adenin, Guanin, Hypoxanthin	22,8	22,7
10 γ PABS; 5 mg Sulf.; je 10 mg Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Thymin	23,9	24,0
10 γ PABS; 5 mg Sulf.; je 10 mg Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Uracil	22,8	—
je 10 mg Serin, Threonin, Methionin	18,8	18,7
Vitamin B ₁₂ , 10 γ	0	0

nur das gemeinsame Vorhandensein der Purine eine merkliche Zurückdrängung der Hemmung bewirkt, während sich die Aminosäuren als praktisch wirkungslos erwiesen haben. Die im Gegensatz zu Uracil feststellbare — wenn auch geringe — Wirkung von Thymin legt den Gedanken nahe, daß der Methylrest des Thymins durch den C_1 -Stoffwechsel geliefert wird (Tab.2). Dies ist eine Ergänzung zu den Befunden von REGE u. SREENIVASAN (1954).

Vitamin B₁₂, das nach zahlreichen Untersuchungen an anderen Organismen (SHIVE 1950; GOTS u. CHU EILEEN 1952; FORD u. HUTNER 1955; LOCKINGEN, HUMPHREY u. ORVILLE 1958) eine Beziehung zum C_1 -Stoffwechsel zu haben scheint, zeigt in unseren Versuchen keine wachstumsfördernde oder sulfanilamidenthemmende Eigenschaft.

Bei ungehemmten Kulturen wurde festgestellt, daß außer Folsäure keine der in Tab.2 aufgeführten Substanzen die p-Aminobenzoesäure-Bedürftigkeit des Bakteriums beseitigt. Fehlen von p-Aminobenzoesäure wird immer mit Wachstumsstillstand beantwortet.

II. Einfluß von Wirkstoffen auf Wachstum und Cellulosesynthese

1. Penicillin

Die Zahl der penicillinempfindlichen (hauptsächlich grampositiven) Bakterien ist sehr groß. In neuerer Zeit werden Zusammenhänge zwischen Penicillinwirkung und Zellwandbildung offenkundig (WORK 1957; PARK u. STROMINGER 1957; PARK 1958; ITO u. Mitarb. 1958). Bei *Acetobacter xylinum* ist es uns nur bei der hohen Penicillinkonzentration von 1000 IE (Internationalen Einheiten)/ml gelungen, eine schwache Hemmung (etwa 4%) der Cellulosesynthese zu beobachten; bei einer Konzentration von 75 IE/ml war sogar eine geringe Stimulierung (etwa 5%) der Synthese bemerkbar. Auf Grund dieser Ergebnisse erübrigte sich die Suche nach infolge der Penicillinwirkung angehäuften Zellwandvorstufen, die bei den Arbeiten von PARK u. STROMINGER (1957) und ITO (1958) an *Staphylococcus aureus* zur Erkennung von Uridindiphosphataminosucker-Verbindungen als Zellwandvorläufer geführt hat.

2. Heteroauxin

Da die Primärwirkung des Wuchsstoffes bei der induzierten Zellstreckung in einer Plastizierung der Zellwand bestehen soll (zuletzt NEWCOMBE 1960), schien es interessant, den Einfluß des Heteroauxins auf die reine Cellulosesynthese zu testen, wenn auch eine Identität der Vorgänge bei dem Bakterium und bei der Zellwandbildung der höheren Pflanzen nicht unbedingt besteht.

Die Wirkung der β -Indolylessigsäure auf *Acetobacter xylinum* besteht in einer Hemmung bei hohen Konzentrationen (Tab. 3). Dabei geht die Abnahme des Trockengewichts- und Celluloseertrages annähernd parallel.

Tabelle 3. Einfluß von IES auf die Syntheseleistung von *Acetobacter xylinum*

mol. IES-Konzentration	Trockengewicht mg
0	110
10^{-4}	60
10^{-5}	95
10^{-6}	110
10^{-7}	107
10^{-8}	112

Cumarin, ein Wuchsstoffantagonist, zeigt einen ähnlichen Einfluß auf das Wachstum des Bakteriums. Es ist anzunehmen, daß es sich in beiden Fällen um einen unspezifischen Gifteffekt von Chemikalien handelt. Eine Wachstumsförderung war nie zu beobachten. Nach diesem Befund scheint daher eine Wirkung der β -Indolylessigsäure auf die enzymatischen Vorgänge der Cellulosesynthese (zumindest bei *Acetobacter xylinum*!) nicht gegeben.

III. Zur Chemie der Cellulosesynthese

1. Cellulosesynthese aus Monosen

a) Phosphorylierung. GREATHOUSE (1957) hat die Beteiligung von Adenosintriphosphat (ATP) bei der Cellulosesynthese durch *Acetobacter xylinum* sichergestellt. SCHRAMM, GRONET u. HESTRIN (1957) sicherten

die Reaktionskette: Fructose-6-phosphat \rightleftharpoons Glucose-6-phosphat \rightleftharpoons Glucose-1-phosphat. Mit der Methode von Mc DONALD (1957) konnten wir nun in Zellhomogenaten sowohl Gluco- als auch Fructokinase nachweisen, wobei die Bildung der Enzyme mehr oder minder adaptiv zu denken ist, da auf Fructose gewachsene Zellen sehr stark verminderte Glucokinaseaktivität aufweisen und umgekehrt. Da wir überdies Glucose-6-phosphat aus umfangreichem, auf Glucose gewachsenem Zellenmaterial isolieren konnten (ZIEGLER u. WEIGL 1959) und da GLASER (1957) ein Enzym gefunden hat, welches die Reaktion: Glucose-1-phosphat + UTP \rightleftharpoons UDPG + PP katalysiert, sind Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat als Intermediärprodukte auf dem Weg von Glucose zu Cellulose anzusehen. In welcher Entfernung sie auf dem Syntheseweg zu dem ersten nicht phosphorylierten Di- oder Oligosaccharid stehen, läßt sich jedoch bislang nicht angeben.

b) Beteiligung von Uridindiphosphatglucose (UDPG). Es wäre eine Bekräftigung der Annahme irgendeiner Rolle der UDPG bei der Cellulosesynthese oder doch mindestens ein Hinweis auf das Ausmaß ihrer Beteiligung gegeben, wenn es gelänge, diese Verbindung aus Bakterienmaterial zu isolieren, das auf eingangs erwähnter, synthetischer Nährlösung gewachsen ist.

Aus umfangreichen Kulturen haben wir nun durch Sammeln der an der Oberfläche herangewachsenen Bakterienhäute, Zerschlagen im Starmix und anschließendes Gefriertrocknen 950 g Trockengut gewonnen, das wir nach der Methode von LELOIR u. PALADINI (siehe oben) auf UDPG verarbeitet haben. Die am Ende der Präparation vorliegende Lösung wurde durch Gefriertrocknen eingengt und restlos zu einem einzigen Chromatogramm verwendet. Auf der Höhe der Vergleichs-UDPG konnte bei 254 m μ keine Absorption festgestellt werden.

Bei einem weiteren Versuch wurde eine 10%ige (v:v) Bakterien-suspension in 500 ml Nährlösung, die ein Zehntel des gewöhnlich zur Kultur verwendeten Phosphatgehalts enthielt, mit 0,2 mc radioaktivem Phosphat versehen und 6 Std bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet und wie oben angegeben weiterverarbeitet. Anschließende Chromatographie und Autoradiographie enthüllten in Höhe des Vergleichs-UDPG äußerst schwache Radioaktivität. Das ausgeschnittene Papier zeigte gegenüber der Umgebung 58 IPM. Auf der Höhe von Uridindiphosphat (UDP) war keine Aktivität zu bemerken. Bei beiden Versuchen konnte in den gebrauchten Nährlösungen weder UDPG noch UDP nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß UDPG und verwandte Substanzen innerhalb und vor allem auch außerhalb der *Acetobacter*-Zellen nur in sehr geringen Mengen — etwa im Vergleich zu Hefezellen! — vorliegen können.

2. Cellulosesynthese aus Disacchariden

Theoretisch denkbar wäre eine Cellulosebildung durch Transglucosidierung aus Disacchariden analog der Dextran- und Lävianbildung (GOODMAN, WEIL u. STERN 1955; FEINGOLD u. Mitarb. 1956; LAILEY u. OXFORD 1958).

a) α -glucosidisch gebundene Disaccharide. Da intakte Zellen auf Saccharose und Maltose (Maltotriose und Amylodextrinen) gut gedeihen und dabei reichlich Cellulose bilden, schien die Frage einer Eignung dieser Stoffgruppe als Cellulosebaustein einer Prüfung wert. Es zeigte sich, daß zellfreie Enzymsysteme nicht zur Cellulosesynthese aus Saccharose und Maltose fähig sind: Radioaktive Saccharose (25 800 IPM) wurde mit einer zellfreien Enzymlösung 6 Std bei 30°C und pH 7,8 (m/5 Phosphatpuffer) inkubiert. Es konnte anschließend keine radioaktive Cellulose festgestellt werden. Im Reaktionsgemisch konnten wohl Glucose und Fructose, jedoch keine phosphorylierten Zucker, kein UDPG und keine Oligosaccharide nachgewiesen werden, so daß wir keinen Hinweis auf eine phosphorolytische Spaltung oder Transglucosidaseaktivität haben. Da bei der Inkubation von Maltose Glucose auftritt, ohne daß dabei das Auftreten von Cellulose zu registrieren ist, scheinen hier ähnliche Verhältnisse vorzuliegen.

Aus den bei der Saccharosespaltung auftretenden Zuckern wurde bei Zusatz von 2% ATP im Laufe weiterer 12 Std radioaktive Cellulose (140 IPM) polymerisiert.

b) Cellobiose. Unser zellfreies Enzymsystem vermag auch nicht aus Cellobiose (sowie Cellotriose, Cellotetraose und Cellohexaose) Cellulose zu synthetisieren. Zusatz von 2–4% ATP bewirkt jedoch im Falle der Cellobiose wiederum meßbare Cellulosesynthese. Da hier im Reaktionsgemisch keine Glucose nachzuweisen ist, also sicher hydrolytische Spaltung fehlt, ist der Mechanismus dieses Effektes vorläufig unklar; man kann höchstens in einer möglichen Anfangsreaktion der Cellulosesynthese: $XG + G \rightleftharpoons G_2 + X$ (G = Glucose; G_2 = Cellobiose; X bedeutet den in einem zu postulierenden Glucosedonator mit Glucose verbundenen Rest) eine Gleichgewichtsverschiebung nach links durch Entzug der Glucose mittels Phosphorylierung vermuten. Wichtiger scheint uns aber die Feststellung, daß direkter Glucoseaustausch zwischen Disacchariden und Cellodextrinen nach dem Schema der Dextranbildung ($ZG + G_n \rightleftharpoons G_{n+1} + Z$, wobei Z den anderen im Disaccharid vorhandenen Zuckeranteil darstellt) oder der mit Transglucosidierung einhergehenden Spaltung von Disacchariden (GIRI 1954; BUSTON u. JABBAR 1954; CROOK u. STONE 1957) bei der Cellulosesynthese durch *Acetobacter xylinum* keine Rolle spielt.

3. Cellulosesynthese aus C_3 -Körpern

Intakte Zellen synthetisieren aus Glycerin, Dioxyaceton, Milchsäure und Brenztraubensäure Cellulose, wenngleich dieser Prozeß äußerst

langsam verläuft im Vergleich zur Synthese aus Glucose, Fructose, Saccharose usw. Von lebenden Zellen freie Präparate besitzen diese Fähigkeit nicht.

4. β -glucosidisch gebundene Oligosaccharide als Zwischenstufen auf dem Weg zur Cellulose

In dem auf S. 352 beschriebenen Ansatz zur Gewinnung radioaktiver Cellulose wurde die Synthese durch kurzes Aufkochen gestoppt, die Cellulose durch Zentrifugieren bei 25000 g entfernt und der weiteren Verarbeitung zugeführt. Die cellulosefreie Lösung wurde durch Behandlung mit je 2 ml eines basischen und sauren Ionenaustauschers (Amberlite IR 45 und IR 50, 20—50 mesh) von den Ionen befreit, gefriergetrocknet, mit 1 ml heißem Wasser erneut aufgenommen und als Band in Butanol/Dimethylformamid/Wasser (2:1:1) 3 mal über 24 Std aufsteigend chromatographiert. Das Autoradiogramm zeigte nach zehntägigem Exponieren über der Glucose (d.h. also schneller laufend) drei Bänder, die demnach zu nicht als Zwischenstufen der Cellulosesynthese in Betracht kommenden Substanzen gehören müssen; unter der Glucose konnten neben anderen in Höhe der authentischen Vergleichssubstanzen (Cellobiose, Cellotriose, Cellotetraose) sehr schwach radioaktive Bänder erkannt werden, die wir jedoch vor weiterer Untersuchung noch nicht endgültig mit Cellobiose, Cellotriose usw. identifizieren möchten.

An der Startlinie war sehr starke Radioaktivität zurückgeblieben; die radioaktiven Substanzen konnten durch einstündiges Kochen mit 10 ml Wasser im Rückflußkühler restlos eluiert werden. Das Eluat wurde gefriergetrocknet, mit 0,5 ml m/10 Phosphatpuffer p_H 4,8 aufgenommen und nach Zusatz von 0,5 ml einer „Cellulaselösung“ 14 Std bei 28°C inkubiert. [Die Cellulase wurde aus der Nährlösung von *Merulius lacrymans*-Kulturen gewonnen (siehe folgende Arbeit)¹; sie war gegenüber der Nährlösung etwa zwanzigfach angereichert und frei von Amylase.] Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch, wie oben beschrieben, vom Puffer befreit und abermals in But./Dmfa/H₂O chromatographiert. Die Autoradiographie enthüllte, daß die ursprünglich nicht wandernde Radioaktivität schätzungsweise zu 80% verschwunden und eindeutig in radioaktive Glucose, Cellobiose und — in geringerer Menge — Cellotriose übergegangen war.

Diskussion

SCHRAMM (1955) hatte auf Grund von Isotopenversuchen, bei welchen die am C₁ der Glucose angebrachte ¹⁴C-Markierung in der aus der synthetisierten Cellulose wiedergewonnenen Glucose nur zu 10% an Ort und Stelle erhalten war, angenommen, daß die Glucosemoleküle nicht direkt als Monomere zu Cellulose polymerisiert werden, sondern vorher einer

¹ Erscheint demnächst im Archiv für Mikrobiologie.

Spaltung in kleinere Einheiten bedürfen, aus welchen dann erst die Celluloseketten zusammengefügt werden. Diese Ansicht schien gestützt zu werden durch die Feststellung (SCHRAMM, GRONET u. HESTRIN 1955), daß Trockenpräparate auch aus Dioxyaceton und Glycerin Cellulose bilden. Zu einer ähnlichen Anschauung kamen BOURNE u. WEIGEL (1954). Da diese Meinung erhebliche Verbreitung gefunden hat (RIPPEL-BALDES 1955; PRESTON 1958; FREY-WYSSLING 1959), sei kurz darauf eingegangen.

Es ist selbstverständlich, daß ein lebendes System, das aus einer vorliegenden Substanz bestimmten Energiegehalts (hier Glucose) eine Substanz höheren Energiegehalts (Cellulose) synthetisieren soll, einen Teil der vorliegenden Substanz (Glucose) zur Gewinnung der dazu nötigen Energiezufuhr verwerten muß. Dies geschieht durch den mit Phosphorylierung gekoppelten Abbau. Der die Ökonomie dieses Prozesses ausdrückende Quotient: zu Cellulose synthetisierte Glucose / abgebaute Glucose wird unter ungünstigen Bedingungen klein sein (namentlich dann, wenn dem Bakterium die zweite Energiequelle der Alkoholoxydation nicht geboten wird), d.h. es wird wenig Glucose direkt in Cellulose eingebaut werden. Der größte Teil des in der Glucose vorliegenden Kohlenstoffgerüsts geht zuerst durch das Getriebe des Stoffwechsels und wird teilweise zu Glucose oder einer Glucoseverbindung resynthetisiert, wodurch die Veränderungen der an einem bestimmten C-Atom spezifisch angebrachten Markierung verständlich wird. C₃-Verbindungen, die auf dem Weg dieses Stoffumsatzes liegen oder in diesen einbezogen werden können, werden somit auch teilweise in die Cellulose eingehen. Zur energetischen Koppelung zwischen oxydativem Abbau und Synthese sind jedoch nur lebende Systeme befähigt (es ist gegenwärtig noch nicht möglich, mit zellfreien Präparaten oxydative Phosphorylierung vorzunehmen). Wahrhaft zellfreie Systeme (Trockenpräparate sind nicht frei von intakten Zellen!) sind nicht in der Lage, aus Glucose oder C₃-Verbindungen ohne Zusatz von ATP Cellulose zu synthetisieren. Andererseits wird aber ein Cellulose synthetisierendes Enzym an dem Glucosegerüst nichts verändern. Daß Glucose ungespalten und direkt in Cellulose übergehen kann, wird durch eine Untersuchung von GREATHOUSE (1957), wonach tatsächlich annähernd der theoretische Wert von 100% der Glucose unverändert in der Cellulose wiedergefunden wurde, und durch den Nachweis der Glucokinase sichergestellt.

Die bedeutende Stellung der UDPG bei Synthesen von Di- bis Polysacchariden als „aktivierte Glucose“ ist offensichtlich (siehe z.B. LELOIR u. CARDINI 1957). Eine Untersuchung von WRIGHT u. ANDERSON (1959) nährt die Vermutung, daß bei *Dictyostelium discoideum* UDPG in Beziehung zu der während der Bildung des Sporangienstieles stattfindenden Cellulosesynthese steht. PARK u. STROMINGER (1957) sowie ITO u. Mitarb. (1958) sehen in den bei Penicillinhemmung von *Staphylococcus*

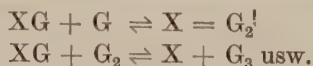
aureus angehäuften Uridindiphosphataminozucker-Verbindungen Zellwandvorstufen. GLASER u. BROWN (1957) betrachten das Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin als Vorläufer des Chitins. Danach würden UDP-Zuckerverbindungen die unmittelbaren Baustoffdonatoren bei Synthesen von Zellwandsubstanzen darstellen.

Während der von uns mitgeteilte Effekt, wonach die Cellulosesynthese einer Bakteriensuspension durch UDPG positiv zu beeinflussen ist (ZIEGLER u. WEIGL 1959), auch mittelbar zustande kommen könnte und somit nichts Sicheres über eine direkte Beziehung der UDPG zur Cellulosesynthese durch *Acetobacter xylinum* aussagt, konnte GLASER (1957) ein Enzym freilegen, das Glucose von UDPG auf Cellodextrine überträgt. Die Erfahrung, daß wir in umfangreichem Bakterienmaterial und der dazugehörigen Nährlösung UDPG und UDP präparativ nicht erfassen konnten und auch nach Inkubation einer Suspension mit radioaktivem Phosphat in den Zellen nur minimale Mengen eines chromatographisch mit UDPG identischen Körpers, außerhalb der Zellen weder UDPG noch UDP nachweisen konnten, läßt es zweifelhaft erscheinen, daß UDPG als unmittelbarer, extracellulärer Glucosedonator der doch äußerst lebhaften Synthese anzusehen ist (vgl. auch COLVIN 1959). Ein diffusibler, extracellulärer Glucosedonator ist aber zu fordern, da die Synthese unter natürlichen Verhältnissen extracellulär stattfindet (MÜHLETHALER 1949) und auch in vitro nicht an das Vorhandensein von Zellwänden gebunden ist, was durch die Wirksamkeit von zellwandfreien Enzymlösungen bewiesen wird. Daß es sich jedoch bei dem postulierten, ATP-unabhängigen Glucosedonator nicht um ein Di- oder Oligosaccharid handeln dürfte, mag daraus zu ersehen sein, daß unser Enzymsystem, welches aus Glucose + ATP (andere etwa nötige Cofaktoren müssen als vorhanden angenommen werden, da sie bei der Präparation nicht eliminiert werden) Cellulose synthetisiert, bei Inkubation mit Cellobiose, Cellotriose, Cello-tetraose und Cellohexaose, Saccharose und Maltose keinerlei transglucosidierende Eigenschaften zeigt.

Cellobiose kann somit nicht als Glucoselieferant:



(wobei G = Glucose, der Index den Polymerisationsgrad bedeutet), sondern höchstens als erstes Polymerisationsprodukt:



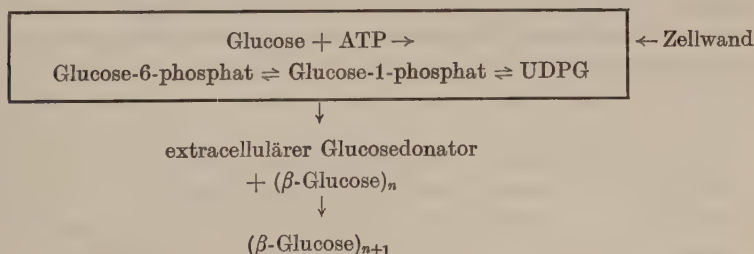
angesehen werden (X bedeutet den in einem Glucosedonator mit Glucose in Bindung stehenden Rest).

Man ist versucht, als Selbstverständlichkeit anzunehmen, daß bei der Cellulosesynthese die Stufen der Cellooligosaccharide und Cellodextrine

durchlaufen werden. Um die experimentelle Prüfung dieser Annahme bemühten sich WALKER u. WRIGHT (1957) mit positivem Erfolg bei *Acetobacter acetigenum*; es gelang ihnen, Cellooligosaccharide als Zwischenstufen bei der Cellulosesynthese dieser Art nachzuweisen. Sowohl COLVIN (1959) als auch unseren Untersuchungen an *Acetobacter xylinum* ist es bisher verwehrt geblieben, die chromatographisch wandernden niedermolekularen Oligosaccharide (Cellobiose, Cellotriose, Cellotetraose, Cellopentaose) einzeln eindeutig nachzuweisen. Wir konnten jedoch im Laufe der Synthese eine wasserlösliche, chromatographisch nicht wandernde Fraktion gewinnen, die bei Behandlung mit *Merulius*-Cellulase zum großen Teil in chromatographisch mit Glucose, Cellobiose und Cellotriose identische Zucker überging. Die weitere Untersuchung wird ergeben, ob wir ein einzelnes definiertes β -glucosidisches Kohlenhydrat oder das Gemisch von wasserlöslichen Cellooligosacchariden und Cello-dextrinen abgebaut haben. Letzteres ist naturgemäß vorerst glaubwürdiger.

Sicher ist, daß die Glucosephosphate an der Bereitstellung eines niedermolekularen, unmittelbar vor der Cellulose stehenden Glucosedonators beteiligt sind (GREATHOUSE 1957; SCHRAMM, GRONET u. HESTRIN 1957; ZIEGLER u. WEIGL 1959), wenn auch das Glucose-1-phosphat nicht selbst als solches zu fungieren scheint, da intakte Zellen aus Glucose-1-phosphat keine Cellulose synthetisieren können (SCHRAMM, GRONET u. HESTRIN 1957).

Die bekannten und die zu fordernden Verhältnisse können wir demnach in folgendes Schema fassen:



Die Natur dieses extracellulären, glucosespendenden Coenzym, dessen Funktion nur in Gemeinschaft mit einem Enzym zu verstehen ist, gilt es also noch aufzufinden.

Zusammenfassung

1. *Acetobacter xylinum* ist streng p-Aminobenzoesäure-bedürftig. Suboptimale Gaben von p-Aminobenzoesäure wirken limitierend auf das Wachstum des Bakteriums, auch dann, wenn die anderen Vitamine in optimaler Konzentration vorliegen.

2. Die p-Aminobenzoesäure ist nur durch Folsäure ersetzbar, nicht etwa durch Pantothersäure, wodurch ihre ausschließliche Bedeutung bei der Folsäuresynthese (bei *Acetobacter xylinum*) angezeigt wird. Die Sulfanilamidhemmung wird durch Folsäure und in geringem Maß durch das gemeinsame Vorhandensein der Purine zurückgedrängt. Thymin scheint die entgiftende Wirkung der Purine etwas zu unterstützen, was für die Vermutung spricht, daß der Methylrest des Thymins durch den C₁-Stoffwechsel bereitgestellt wird.

3. Penicillin zeigt nur in sehr hoher Konzentration äußerst schwache Wachstumshemmung; es ist daher experimentell nicht als Hemmstoff der Cellulosebildung durch *Acetobacter xylinum* zu benutzen, wie das etwa PARK u. STROMINGER an *Staphylococcus aureus* gezeigt haben. Bei geringer Konzentration wurde sogar eine leichte Stimulierung des Wachstums hervorgerufen.

4. Heteroauxin und Cumarin zeigen keine spezifische Wirkung auf die Cellulosesynthese durch *Acetobacter xylinum*.

5. In den gebrauchten Nährlösungen konnte trotz Verwendung von radioaktivem Phosphat weder Uridinphosphat noch Uridindiphosphatglucose nachgewiesen werden; aus den Zellen konnten geringe Mengen einer chromatographisch mit Uridindiphosphatglucose identischen Substanz freigelegt werden. Diese Befunde lassen zweifeln, daß Uridindiphosphatglucose als unmittelbarer extracellulärer Glucoselieferant der Cellulosesynthese anzusehen ist, obwohl ihr nach früheren Untersuchungen ein Platz auf dem Syntheseweg der Cellulose zuzuschreiben ist.

6. Die Fähigkeit zur Cellulosesynthese durch Transglucosidierung aus Cellobiose, Cellotriose, Cellotetraose, Cellohexaose, Saccharose, Maltose und Maltotriose nach dem Schema der Dextranbildung oder der mit Transglucosidierung verbundenen Spaltung von Disacchariden bei anderen Objekten fehlt einem aus *Acetobacter xylinum* gewonnenen Enzymsystem.

7. Aus einem Ansatz zur Synthetisierung von radioaktiver Cellulose (mit weiterer Verarbeitung der Cellulose zu Cellodextrinen und Cellooligosacchariden) konnten die vermuteten Zwischenstufen der Synthese (Cellooligosaccharide) nicht sicher einzeln chromatographisch nachgewiesen werden. Es wurde jedoch eine chromatographisch nicht wandernde Fraktion gewonnen, die beim Abbau mit Cellulase größtenteils in Glucose, Cellobiose und Cellotriose überging, offenbar also aus Cellooligosacchariden und wasserlöslichen Cellodextrinen bestand.

Literatur

- BAILEY, R. W., and A. E. OXFORD: J. gen. Microbiol. **19**, 130 (1958).
BARCLAY, K. S., E. J. BOURNE, M. STACEY and M. WEBB: J. chem. Soc. **124**, 1501 (1954).
BOURNE, E. J., and H. WEIGEL: Chem. and Ind. **32**, 132 (1954).

- BROWN, A. J.: J. chem. Soc. **49**, 172 (1886).
- BUSTON, W., and A. JABBAR: Biochim. biophys. Acta **15**, 543 (1954).
- CAPUTTO, R., L. F. LELOIR, C. E. CARDINI and A. C. PALADINI: J. biol. Chem. **184**, 333 (1950).
- CHARGAFF, E., C. LEVINE and C. GREEN: J. biol. Chem. **175**, 67 (1948).
- COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN: Methods in Enzymology, Bd. III. New York: Academic Press Inc. Publishers 1957.
- COLVIN, J. R.: Nature (Lond.) **183**, 1135 (1959).
- CRAMER, F.: Papierchromatographie. Weinheim (Bergstr.): Verlag Chemie 1958.
- CROOK, E. M., and B. A. STONE: Biochem. J. **65**, 1 (1957).
- FEINGOLD, D. S., G. AVIGAD and S. HESTRIN: Biochem. J. **64**, 351 (1956).
- FORD, J. E., u. S. H. HUTNER: zit. nach LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie, S. 795. Berlin: Walter de Gruyter & Co. 1955.
- FREY-WYSSLING, A.: Science **119**, 80 (1954).
- FREY-WYSSLING, A.: Die pflanzliche Zellwand, S. 15, 103, 104 u. 222. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959.
- FREY-WYSSLING, A., u. R. FREY: Protoplasma (Wien) **39**, 656 (1950).
- FREY-WYSSLING, A., and K. MÜHLETHALER: J. Polymer Sci. **1**, 172 (1946).
- GIRI, K. V., V. N. NIGAM and K. S. SRINIVASAN: Nature (Lond.) **173**, 953 (1954).
- GLASER, L.: Biochim. biophys. Acta **25**, 436 (1957).
- GLASER, L., and D. H. BROWN: J. biol. Chem. **228**, 729 (1957).
- GOODMAN, A., R. M. WEIL and K. G. STERN: J. biol. Chem. **217**, 977 (1955).
- GOTS, J. S., and C. CHU EILEEN: J. Bact. **64**, 537 (1952).
- GREATHOUSE, G. A.: J. Amer. chem. Soc. **79**, 4503 (1957).
- GREENBERG, G. R., L. JAENICKE and M. SILVERMAN: Biochim. biophys. Acta **17**, 589 (1955).
- GREENBERG, G. R., L. JAENICKE and M. SILVERMAN: Fed. Proc. **13**, 745 (1954).
- HANES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949).
- HERMANS, P. H., and A. WEIDINGER: J. Polymer Sci. **4**, 135 (1949).
- HESTRIN, S., and M. SCHRAMM: Biochem. J. **58**, 345 (1954).
- HUBBERT, H.: Science **71**, 419 (1930).
- HOUGH, L., J. K. N. JONES and W. H. WADMAN: J. chem. Soc. **120**, 1702 (1950).
- ITO, E., N. ISHIMOTO and M. SATTO: Nature (Lond.) **181**, 906 (1958).
- JERMYN, M. A.: Thesis, Cambridge 1949; zit. nach PAECH und TRACEY, siehe unten (Bd. 2, S. 204).
- KATANUMA, N., T. SHODA and H. NODA: J. Vitaminol. **3**, 77 (1957).
- KAUSHAL, R., and T. K. WALKER: Nature (Lond.) **160**, 572 (1947).
- KAUSHAL, R., and T. K. WALKER: Biochem. J. **48**, 618 (1951).
- KING, T. E., and V. N. CHELDELIN: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **84**, 591 (1953).
- LEDERER, E., and M. LEDERER: Chromatography, S. 261. Amsterdam, London, New York, Princeton: Elsevier Publishing Company 1957.
- LELOIR, L. F., and C. E. CARDINI: J. Amer. chem. Soc. **79**, 6340 (1957).
- LE PAGE, G. A., and W. W. UMBREIT: J. biol. Chem. **147**, 236 (1943).
- LINSKENS, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.
- LOCKINGEN, L. S., R. M. HUMPHREY and O. WYSS: J. Bact. **76**, 104 (1958).
- MARK, H., u. G. v. SUSICH: Z. physik. Chem., Abt. B **4**, 431 (1929).
- MCDONALD, M. R.: In: COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN: Methods in enzymology, Bd. I, S. 269. New York: Academic Press Inc. Publishers 1957.
- MEYER, K. H., L. HUBER u. E. KELLENERBERGER: Experientia (Basel) **7**, 216 (1951).
- MÜHLETHALER, K.: Makromolekulare Chem. (B) **2**, 143 (1948).
- MÜHLETHALER, K.: Biochim. biophys. Acta **3**, 15, 527 (1949).

- MÜHLETHALER, K.: *Exp. Cell Res.* **I**, Nr. 2 (1950).
- MILLER, G., and R. BLUM: *J. biol. Chem.* **218**, 131 (1956).
- NEWCOMBE, E.: In: RUHLAND, W.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 14. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer (im Druck).
- PAECH, K., u. M. V. TRACEY: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 2, S. 41. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.
- PALADINI, A. C., and L. F. LEOIR: *Biochem. J.* **51**, 426 (1952).
- PARK, J. T.: *Biochem. J.* **70**, 2 P (1958).
- PARK, J. T., and J. L. STROMINGER: *Science* **125**, 99 (1957).
- PRESTON, R. D.: In: RUHLAND, W.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 6. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1958.
- PURKO, M., W. O. NELSON and W. A. WOOD: *J. Bact.* **66**, 561 (1953).
- PURKO, M., W. O. NELSON and W. A. WOOD: *J. biol. Chem.* **207**, 51 (1954).
- RAINBOW, C., and G. W. MITSON: *J. gen. Microbiol.* **9**, 371 (1953).
- RANBY, B. G.: *Ark. Kemi* **4**, 241 (1952).
- REGE, D. V., and A. SREENIVASAN: *J. biol. Chem.* **208**, 471 (1954).
- RIPPEL- BALDES, A.: *Grundriß der Mikrobiologie*, 3. Aufl., S. 254. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.
- SCHEEL, K. C.: *Z. analyt. Chem.* **105**, 256 (1936).
- SCHRAMM, M.: *Bull. Research Council Israel*, Sect. A **5**, No. 1 (1955).
- SCHRAMM, M., Z. GRONET and S. HESTRIN: *Bull. Research Council Israel*, Sect. A **5**, No. 1 (1955).
- SCHRAMM, M., Z. GRONET and S. HESTRIN: *Nature (Lond.)* **179**, 28 (1957).
- SCHWEIZER, E.: *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* **2**, 395 (1857).
- SCHWEIZER, E.: *J. prakt. Chem.* **72**, 109 (1857).
- SHIVE, W.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **52**, 1212 (1950); zit. nach LEUTHARDT, F.: *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, S. 795. Berlin: Walter de Gruyter u. Co. 1955.
- SIVA SANKUR, D. V.: *Nature (Lond.)* **181**, 629 (1958).
- STAUDINGER, H.: *Svensk. kem. T.* **49**, 3 (1937).
- STREHRER, B. L.: *J. Bact.* **59**, 105 (1950).
- THEORELL, T.: *Biochem. Z.* **230**, 1 (1931).
- WALKER, T. K., and H. B. WRIGHT: *Arch. Biochem.* **69**, 362 (1957).
- WHISTLER, R. L., and D. F. DURSO: *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 677 (1950).
- WISSELINGH, C. VAN: *Chem. Zentr.* **21**, 522 (1917).
- WORK, E.: *Nature (Lond.)* **179**, 841 (1957).
- WRIGHT, B., and M. ANDERSON: *Biochim. biophys. Acta* **31**, 310 (1959).
- ZECHMEISTER, L., u. G. TOTH: *Chem. Ber.* **64**, 854 (1931).
- ZIEGLER, H., u. J. WEIGL: *Naturwissenschaften* **46**, 20 (1959).

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

Zur Systematik der Actinomyceten

5. Die Art *Streptomyces albus* (Rossi-Doria emend. Krinsky) Waksman et Henrici 1943*

Von
R. HÜTTER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. November 1960)

Zahlreiche Veröffentlichungen auch der letzten Jahre befassen sich mit der Systematik von Actinomyceten (z. B. BALDACCII 1958, ETTLINGER u. Mitarb. 1958, GAUSE u. Mitarb. 1958, PRIDHAM u. Mitarb. 1958, SHINOBU 1958, KRASSILNIKOV 1959, 1960a, 1960b, MAYAMA 1959, WAKSMAN 1959a, FLAIG u. KUTZNER 1960). Die Auffassungen über die für die Arteinteilung maßgebenden Kriterien divergieren stark; auch die Bemühungen verschiedener Diskussionsgruppen (Chicago 1958, Stockholm 1958, Tokyo 1959) haben noch nicht wesentlich zur Vereinheitlichung beigetragen.

Die Charakterisierung von Arten wird oft an Hand der bestehenden Beschreibungen oder auf Grund des Studiums eigener Isolierungen vorgenommen, und die Typuskulturen werden nicht zum Vergleich herangezogen. Wie bereits ETTLINGER u. Mitarb. (1958) betont haben, ist aber eine zuverlässige Bestimmung nur bei Berücksichtigung der Typen möglich, und Synonymieen dürfen ausschließlich nach direktem Vergleich der entsprechenden Typuskulturen aufgestellt werden. Für die Bezeichnung der Typen verwende ich die in dem „International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses“ (1958) festgelegten Bezeichnungen; die von CIFERRI (1957) vorgeschlagenen Begriffe scheinen mir zu stark differenziert.

Als artcharakterisierende und artdifferenzierende Merkmale betrachte ich die bereits bei ETTLINGER u. Mitarb. (1958) angeführten Kriterien: Morphologie der Sporenoberfläche, Farbe und Morphologie des Luftmycels, Chromogenität. Die Zuverlässigkeit der Struktur der Sporenoberfläche bestätigen neuerdings die Untersuchungen sowohl von TRESNER u. Mitarb. (1960) wie auch von PREOBRAJENSKAYA u. Mitarb. (1959, 1960). Den Wert von Farbe und Morphologie des Luftmycels haben in letzter Zeit BALDACCII (1958), GAUSE u. Mitarb. (1957, 1958),

* 4. Mitteilung: Arch. Mikrobiol. **31**, 326 (1958).

OKAMI u. SUZUKI (1958), PRIDHAM u. Mitarb. (1958), SHINOBU (1958), MAYAMA (1959) sowie FLAIG u. KUTZNER (1960) hervorgehoben.

Als Ergänzung des Chromogentestes habe ich noch die damit parallel gehende Tresner-Danga-Reaktion (TRESNER u. DANGA 1958) eingeführt, die in kürzerer Zeit eindeutigere Ergebnisse liefert. Es scheint sich dabei um einen die gleichen Fähigkeiten anzeigenden Test zu handeln wie bei der Chromogenprobe¹.

Zusätzlich führe ich auch die von der Stockholmer Diskussionsgruppe (Stockholm 1958) für die Artcharakterisierung empfohlene Farbvariation des Substratmycels auf. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von BALDACCI (1958) und von GAUSE u. Mitarb. (1957, 1958) eignet sich aber nach unseren Untersuchungen dieses Merkmal nicht für die Artdifferenzierung (vgl. ETTLINGER u. Mitarb. 1958).

Für das Studium des Luftmycels und des Substratmycels ließ ich die Kulturen meist auf dem von PRIDHAM u. Mitarb. (1956—1957) vorgeschlagenen Hefeextrakt-Agar wachsen; bei schlechter Entwicklung wurden noch Tomatenpüree-Hafermehl-Agar, Hickey-Tresners Agar und Carvajals Hafermehl-Agar verwendet.

Für die Überlassung von Kulturen und von Informationen danke ich Madame J. NICOT, Paris, Dr. R. E. GORDON, New Brunswick N. J., Prof. E. BALDACCI, Mailand, Prof. L. SILVESTRI, Mailand, Prof. S. A. WAKSMAN, New Brunswick N. J., Dr. L. E. ARNOW, Morris Plains N. J., Dr. C. W. HESSELTINE, Peoria Ill., Dr. E. J. OSWALD, Washington D. C., Dr. T. G. PRIDHAM, Peoria Ill., Dr. G. A. DE VRIES, Baarn, und Dr. F. A. WEISS, Washington D. C.

I. Die Art *Streptomyces albus* (Rossi-Doria emend. Krainsky) Waksman et Henrici 1943

Als WAKSMAN u. HENRICI (1943) die Gattung *Streptomyces* begründeten, bezeichneten sie *Actinomyces albus* Rossi-Doria emend. Krainsky 1914 als Typus; sie betrachteten diese Art als weitverbreitet und gut bekannt. Seit ROSSI-DORIA (1891) und KRAINSKY (1914) haben vor allem WAKSMAN u. CURTIS (1916), CHALMERS u. CHRISTOPHERSON (1916), WAKSMAN (1919), DUCHÉ (1934), BALDACCI (1939, 1940) und KRASSILNIKOV (1941) diesen Organismus untersucht und auf Grund von Vergleichen der Beschreibungen vieler Arten eine teilweise sehr weitgehende Synonymie aufgestellt (vgl. auch BALDACCI 1947, KRASSILNIKOV 1949, 1959). Wie bereits oben angeführt, läßt sich jedoch die Zusammengehörigkeit von Formen nicht durch Gegenüberstellung von kurzen Beschreibungen, sondern nur durch direkten Vergleich der Typusmaterialien feststellen. Wesentlich ist daher die Fixierung der Typen.

Die älteste mir bekannte Kultur von *Streptomyces albus* ist Stamm ATCC 618. Diese Kultur wurde von KRAINSKY 1914 in BEIJERINCKs

¹ Persönliche Mitteilung von Prof. L. SILVESTRI vom 26. Februar 1960 (TURRI u. SILVESTRI 1960)

Labor isoliert¹; von BELJERINCK gelangte sie 1918 an das CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande). Vom CBS wurde der Stamm 1922 an KLUYVER geschickt, der den Organismus seinerseits 1926 an die ATCC (American Type Culture Collection, Washington 7 D.C., USA) abgab. Wir verwenden diese Krainsky-Isolierung als Neotypus der Art *S. albus*. Der gleiche Stamm wurde 1932 an DUCHÉ gesandt, der ihn zum Typus der Art *Actinomyces Almquisti* Duché 1934 machte.

Nicht mit dem Neotypus stimmen folgende, als *S. albus* bezeichnete Stämme überein: ATCC 3004 (WAKSMAN) und NRRL B-1685; nach ETTLINGER u. Mitarb. (1958) handelt es sich dabei um Organismen der Art *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948.

Nur von verhältnismäßig wenigen, früher als Synonyme zu *S. albus* gestellten Arten sind Typuskulturen vorhanden. An Hand dieser Kulturen läßt sich ein kleiner Teil der Organismen als zu *S. albus* gehörend erkennen, während der größere Teil Glieder anderer Arten darstellt. Ähnliche Ergebnisse scheinen PRIDHAM u. LYONS (1960) erhalten zu haben.

Von den meisten Arten sind meines Wissens keine Kulturen mehr vorhanden, und die oft sehr mangelhaften Beschreibungen erlauben auch keine zuverlässige Identifizierung mehr. Diese Arten sind als *nomina dubia* in die Liste der *nomina rejicienda* aufzunehmen (vgl. International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses 1958, Rule 24f S. 92).

In neuerer Zeit sind auch Produzenten verschiedener Antibiotica als *S. albus* identifiziert worden. Eine Untersuchung der erhältlichen Kulturen oder der Beschreibungen zeigt aber, daß sie meist nicht mit dem Typusstamm ATCC 618 übereinstimmen, sondern in andere Arten eingeordnet werden müssen.

Streptomyces albus (Rossi-Doria emend. Krainsky) Waksman et Henrici. — J. Bact. 46, 339 (1943).

Typus (Neotypus)

Streptomyces albus Stamm ATCC 618, isoliert von RAINSKY 1914.

Synonyme

Streptotrix alba Rossi-Doria. — Ann. Ist. Ig. sperim., Univ. Roma 1 (N. S.), 421 (1891).

Cladothrix alba Macé. — Traité Prat. Bactériol. 3. Aufl. (1897).

Nocardia alba Chalmers et Christopherson. — Ann. Trop. Med. Parasitol. 10, 270 (1916).

Nocardia alba Froilano de Mello et St. Antonio Fernandez. — Mem. Asiatic Soc. Bengal 7, 105 (1919) (ex DODGE 1935, S. 725).

Actinomyces albus Krainsky. — Zbl. Bakt., II. Abt. Orig. 41, 662, 683 (1914).

Actinomyces albus Waksman et Curtis. — Soil Sci. 1, 117 (1916) (vide etiam WAKSMAN 1919, S. 93).

¹ Persönliche Mitteilung von Dr. G. A. DE VRIES vom 15. Juli 1960.

Actinomyces albus Krassilnikow. — Bestimmungsbuch für Actinomyceten (russisch), Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskau 1941.

Non *Streptothrix alba* I Sanfelice 1904, nec *Streptothrix alba* Bellisari 1904, nec *Actinomyces albus* Tarozzi 1909 quae sunt nomina dubia; nec *Oospora alba* (Preuss) Sacc. et Vogl. in SACCARDOS Syll. Fung. 4, 13, 1886, quae est *Hyphomyces* sp.

Actinomyces Almquisti Duché. — Encyclopédie Mycologique 6, 278 (1934).

Streptomyces aminophilus Wooldridge. — Dtsch. Pat. Anm. DAS 1000966, 17. Jan. 1957.

Actinomyces bovis albus Gasperini. — Atti Soc. Tosc. Nat. P. V. 9, 64 (1894).

Actinomyces chromogenus Gasperini p. p. — Zbl. Bakt., Ref. 15, 684 (1894).

Actinomyces chromogenus alba Lehmann et Neumann. — Atlas und Grundriß Bakteriell., 2. Aufl., J. F. Lehmann, München 1899, S. 433.

Streptomyces coelicolor var. *aminophilus* Wooldridge. — Brit. Pat. 828792, 24. Sept. 1960.

Oospora Doriae Sauvageau et Radais. — Ann. Inst. Pasteur 6, 242 (1892) (nom. nov. pro nomine *Streptotrix alba* Rossi-Doria).

(Non *Sporotrichum* sp. Dor, quod est nomen dubium).

Actinomyces flocculus Duché. — Encyclopédie Mycologique 6, 300 (1934).

Streptomyces flocculus Waksman et Henrici. — Bergey VI, 955 (1948).

ev. *Streptothrix Foersteri* Gasperini. — Ann. micrograph. (Paris) 2, 462 (1890).

(Non *Streptothrix Foersteri* Cohn 1875, quae est nomen dubium.)

Actinomyces rangoon Erikson. — Med. Res. Council, Spec. Rept. Ser. 203, 36 (1935)¹.

Nocardia rangoonensis Waksman et Henrici. — Bergey VI, 911 (1948).

Actinomyces saprophyticus Gasperini. — Ann. Ist. Ig. sperim., Univ. Roma 2 (N. S.), 226 (1892) (nom. nov. pro nomine *Streptotrix alba* Rossi-Doria).

(Non *Nocardia saprophytica* Chalmers et Christopherson 1916, quae est nomen dubium *Streptothrix leucae saprophytica* Foulerton et Price-Jones 1902.)

Untersuchte Kulturen

Streptomyces albus Stamm ATCC 618 (ETH 24457), isoliert von KRAINSKY 1914; Neotypus von *Streptomyces albus* (Rossi-Doria emend. Krainsky) Waksman et Henrici 1943 und Holotypus von *Actinomyces Almquisti* Duché 1934.

Streptomyces albus Stamm Nr. 849 (resp. Nr. C 13 R 5 in BALDACCI 1939, 1940, ETH 28481).

Streptomyces aminophilus Stamm Nepera 1968 (NRRL 2390, ETH 24360 und 24405); Holotypus von *Streptomyces aminophilus* Wooldridge 1957 und von *Streptomyces coelicolor* var. *aminophilus* Wooldridge 1960.

Streptomyces flocculus Stamm Nr. 373 (ETH 24454), erhalten von Madame J. NICOT; Holotypus von *Actinomyces flocculus* Duché 1934.

Nocardia rangoonensis Stamm ATCC 6860 (NCTC 1678, ETH 24395); Holotypus von *Actinomyces rangoon* Erikson 1935.

Streptomyces sp. Stamm Nr. 1 des Experimentes der Diskussionsgruppe von Stockholm 1958 (ETH 24132).

Streptomyces sp. Stamm Nr. 838 des Mikrobiol. Laboratoriums der Dermatol. Klinik des Kantonsspitals Zürich (ETH 28420); isoliert von Dr. E. FISCHER aus einer Lungenzyste.

¹ Die Synonymie von *Nocardia rangoonensis* Stamm ATCC 6860 mit *Streptomyces albus* Stamm ATCC 618 wurde bereits von Dr. R. E. GORDON in einem Brief an Dr. F. A. WEISS vom 26. Juli 1957 betont.

Charakterisierung

Sporen ellipsoidisch, $0,8-1,4 \times 0,4-0,9 \mu$ groß, mit glatter Oberfläche, selten wenig warzig (Abb. 1).

Luftmycel weiß, hell weißgelb oder hell weißgrau (*niveus*).

Sporenketten in kurzen geschlossenen, seltener offenen Spiralen von meist 2—5 Windungen; monopodial verzweigt, gelegentlich in wenig ausgeprägten Wirteln (Photographieen bei NOMI 1960; Abb. 2).



Abb. 1. Sporen von *S. albus* Stamm ATCC 618, Vgr. etwa 15000ma



Abb. 2. Mikroskopische Morphologie des Luftmycels von *S. albus*, Vgr. etwa 1600mal

Keine Melaninbildung auf peptonhaltigen Nährmedien und negative Tresner-Danga-Reaktion.

Substratmycel meist weißgelb bis hellgelb, seltener gelbbraun oder hellbraun.

Antibiotica

Antibioticum 1968 (Nepera) aus Stamm Nepera 1968 sub *S. aminophilus* (OSWALD u. Mitarb. 1955—1956, WOOLDRIDGE 1957) resp. Antibioticum NC 1968 aus Stamm NRRL 2390 sub *S. coelicolor* var. *aminophilus* (WOOLDRIDGE 1960).

II. Artfremde Glieder, die zu *Streptomyces albus* gestellt worden sind

Streptotrix albedo-flava Rossi-Doria 1891 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 348).

Actinomyces albidus Duché 1934 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 348).

Actinomyces albosporus Krainsky emend. Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 348).

Actinomyces alboriridis Duché 1934 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (unpublizierte Untersuchung des Neotypus Stamm Nr. 68; isoliert von P. LABOUREUR, erhalten von Madame J. NICOT).

Streptomyces albus var. *cobaltofaciens* nom. nud. in TRESNER et DANGA 1958 = *Streptomyces albogriseolus* Benedict et al. 1954 (persönliche Mitteilung von Dr. E. J. BACKUS vom 27. Juli 1959).

Actinomyces albus var. *cretaceus* Wollenweber 1920 vide *Oospora cretacea* Krüger 1890.

Actinomyces albus var. *ochroleucus* Wollenweber 1920 vide *Actinomyces ochroleucus* Neukirch 1902.

Actinomyces aureus Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces californicus Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Streptothrix candida (*Gedanensis* II) Petruschky 1898 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349; Non *Actinomyces candidus* Krassilnikov 1941, qui est nomen dubium).

Actinomyces cellulosa Krainsky 1914 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces chromogenus 205 Waksman 1919 vide *Actinomyces olivochromogenus* Bergey et al. 1925.

Actinomyces citreus Krainsky emend. Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349; Non *Actinomyces citreus* Gasperini 1894, qui est nomen dubium).

Oospora cretacea Krüger 1890 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces flavogriseus Duché 1934 = *Streptomyces fradiae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 353).

Actinomyces flavus Krainsky emend. Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces olivaceus* (Waksman) Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 354).

Actinomyces griseoflavus Krainsky 1914 = *Streptomyces griseoflavus* (Krainsky) Waksman et Henrici 1948 (WAKSMAN u. HENRICI 1948, S. 948).

Actinomyces halstedii Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces olivaceus* (Waksman) Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 354).

Actinomyces Heimi Duché 1934 = *Streptomyces flaveolus* (Waksman) Waksman et Henrici 1948 (WAKSMAN u. HENRICI 1948, S. 936).

Actinomyces lipmanii Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces Krainskyi Duché 1934 = *Streptomyces erythraeus* (Waksman) Waksman et Henrici 1948 (WAKSMAN u. HENRICI 1948, S. 938).

Actinomyces lavenderae Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces lavenderae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici 1948 (WAKSMAN u. HENRICI 1948, S. 944).

Actinomyces microflavus Krainsky 1914 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces ochroleucus Neukirch 1902 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 348).

Cladothrix odorifera Rullmann emend. Lachner-Sandoval 1898 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces olivochromogenus Bergey et al. 1925 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces phenotolerans Werkman 1934 = *Nocardia asteroides* (Eppinger) Blanchard 1895 (GORDON u. MIHM 1957, BOJALIL u. CERBON 1959).

Actinomyces reticuli Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces reticuli* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici 1948 (WAKSMAN u. HENRICI 1948, S. 944).

Actinomyces roseodiataticus Duché 1934 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (ETTLINGER u. Mitarb. 1958, S. 349).

Actinomyces rutgersensis Waksman et Curtis 1916 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (unpublizierte Untersuchung des Holotypus Stamm ATCC 3350).

Streptothrix sanninii Ciferri 1922 (sub *Actinomyces sanninii* Ciferri in BALDACCI 1937) = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (unpublizierte Untersuchung des Holotypus CBS Stamm CIFERRI).

Nocardia transvalensis Pijper et Pullinger 1927 = *Nocardia asteroides* (Eppinger) Blanchard 1895 (BOJALIL u. CERBON 1959).

Actinomyces viridis Duché 1934 = *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 [unpublizierte Untersuchung des Holotypus Stamm Nr. 145, erhalten von Madame J. NICOT; Non *Streptothrix viridis* Lombardo-Pellegrino 1903, nec *Actinomyces viridis* Millard et Burr 1926, quae sunt *Streptomyces viridis* (Lombardo-Pellegrino) Waksman 1953].

Actinomyces viridochromogenes Krainsky 1914 = *Streptomyces viridis* (Lombardo-Pellegrino) Waksman 1953 (unpublizierte Untersuchung des Neotypus CBS Stamm WAKSMAN u. CURTIS).

III. Antibiotica aus artfremden oder nicht identifizierbaren Produzenten

Actinoflocin neben Toyocamycin, Lutea-Faktor, Myxoviromycin, Niger-Faktor und Polyenen: siehe bei Toyocamycin.

Actinomycetin aus Stamm „G“ (WELSCH 1937): Der Stamm „G“ gehört zu *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948 (vgl. auch PRIDHAM u. Mitarb. 1958, S. 58).

Actinomycetin neben Mucinase: siehe bei Mucinase.

Albofungin aus Stamm Nr. 604/36 (CHOCHLOV u. LIBERMAN 1959, SOLOVYEVA u. RUDAYA 1959, SOLOVYEVA u. Mitarb. 1959, TEBIAKINA u. CHAIKOWSKAYA 1960): Die Beschreibung erlaubt keine sichere Identifizierung und eine Kultur war mir nicht zugänglich.

Albomycetin aus Stamm Nr. T-12 (TAKAHASHI 1954): Der Organismus ist mit grauem Luftmycel und Sporenketten ohne Spiralen beschrieben und kann wohl in die Art *Streptomyces olivaceus* (Waksman) Waksman et Henrici 1948 eingeordnet werden (vgl. HÜTTER u. Mitarb. 1961).

Antibioticum 1-81d-1s aus Stamm NRRL 2490 (HERMANN u. Mitarb. 1957): PRIDHAM u. Mitarb. (1958, S. 67) haben den Stamm nach eigenen Beobachtungen in die rote Serie der Sektion *Spira* eingeordnet.

Antibiotica PA 155A, PA 155B und PA 155X aus Stamm Nr. BA-3972 (RAO 1960, MARSH u. Mitarb. 1960): Nach der Beschreibung weist der Organismus graues bis grau-braunes Luftmycel auf.

Antibioticum WR 3/17 (MORDARSKI u. Mitarb. 1959): Weder eine Kultur noch eine Beschreibung des Produzenten sind mir bekannt.

Imotacidin aus Stamm Nr. B-12-2 und Stamm Nr. C-1-2 (INOUE u. Mitarb. 1959): Der Stamm C-1-2 zeigt graues Luftmycel und enge, geschlossene Spiralen; er kann zu *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) Waksman et Henrici 1948 gestellt werden.

Isomaltose-ähnliches Antibioticum aus Stamm Nr. 2265 (TAKASAWA 1954): Nach dem gelblich-grünlichgrauen Luftmycel und den stark gewellten, in Büscheln stehenden Sporenketten, den glatten Sporen und der fehlenden Chromogenität stelle ich den Stamm Nr. 2265 zur Art *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948.

Lutea-Faktor neben Toyocamycin, Myxoviromycin, Niger-Faktor, Actinoflocin und Polyenen: siehe bei Toyocamycin.

Mucinasen neben Actinomycetin aus Stamm Nr. 52, Stamm Nr. 82 usw. (BERGAMINI 1956): BERGAMINI erhielt die Organismen von Prof. M. WELSCH als *Streptomyces albus*; es dürfte sich dabei um mit dem Stamm „G“ (vgl. unter Actinomycetin) artgleiche Stämme handeln.

Myxoviromycin neben Toyocamycin, Actinoflocin, Lutea-Faktor, Niger-Faktor und Polyenen: siehe bei Toyocamycin.

Niger-Faktor neben Toyocamycin, Actinoflocin, Lutea-Faktor, Myxoviromycin und Polyenen: siehe bei Toyocamycin.

Niromycine aus Stamm Nr. 16d-11, Stamm Nr. 811-A1 und Stamm Nr. A 68-T31 (OSATO u. Mitarb. 1960a, 1960b): Nach der Beschreibung zeigt der Organismus graues Luftmycel; für einen direkten Vergleich waren die Stämme nicht zugänglich.

Polyene neben Toyocamycin, Actinoflocin, Lutea-Faktor, Myxoviromycin und Niger-Faktor: siehe bei Toyocamycin.

Streptothricin-gruppe A aus Stamm Nr. 91 und Stamm Nr. 284 (OKAMI 1949—1950): Kulturen konnte ich nicht untersuchen, doch werden die Stämme mit grauem Luftmycel beschrieben.

Thiolutin aus Stamm NRRL 2401 (SENECA u. Mitarb. 1952): Der Stamm zeigt Sporenketten in Quirlen und kann zu *Streptomyces reticuli* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici 1948 gestellt werden (vgl. auch PRIDHAM u. Mitarb. 1958, S. 72).

Toyocamycin neben Actinoflocin, Lutea-Faktor, Myxoviromycin, Niger-Faktor und Polyenen aus Stamm Nr. E-212 (KIKUCHI 1955, KATAGIRI u. Mitarb. 1957): Der Stamm weist graues Luftmycel und Sporen mit Anhängseln auf.

Xanthothricin aus einem Stamm ähnlich *Streptomyces albus* (MACHLOWITZ u. Mitarb. 1954): Weder eine Kultur noch eine Beschreibung des Produzenten sind mir bekannt.

Unbenanntes Breitspektrum-Antibioticum (VERNON u. DYE 1959): Weder eine Kultur noch eine Beschreibung des Produzenten sind mir bekannt.

IV. Verzeichnis der nomina dubia

Actinomyces acidophilus Jensen 1928.

(Syn.: *Streptomyces acidophilus* Waksman et Henrici 1948.)

Streptothrix alba I Sanfelice 1904.

(Syn.: *Oospora alba* I Sartory 1920—1923.)

Streptothrix alba Bellisari 1904.

(Syn.: *Oospora alba* Sartory 1920—1923,

Actinomyces Bellisari Dodge 1935.)

Actinomyces alboflavus Waksman et Curtis 1916.

(Syn.: *Streptomyces alboflavus* Waksman et Henrici 1948.)

Actinomyces albus Tarozzi 1909.

- (Syn.: *Streptothrix Tarozzii* Miescher 1917,
Actinomyces Tarozzii Dodge 1935.)
Actinomyces albus acidus Neukirch 1902.
- (Syn.: *Actinomyces albus* var. *acidus* Nannizzi 1934.)
Actinomyces albus var. α Ciferri 1927.
Actinomyces albus asporogenes Berestnev 1897.
Actinomyces albus chlamydosporus Krassilnikov 1949.
Actinomyces albus sterilis Krassilnikov 1941.
Actinomyces albus var. *tossica* Rossi 1905.
- (Syn.: *Oospora alba* var. *toxique* Sartory 1920—1923,
Actinomyces tossicus Dodge 1935.)
Actinomyces albus vulgaris Ciani, ex BALDACCII 1937.
Actinomyces albus vulgaris Krassilnikov 1949.
Streptothrix alpha Price-Jones 1900 (ex WAKSMAN et HENRICI 1948, sed BALDACCII 1940 dicit *Oospora alpha* Price-Jones.)
Actinomyces annulatus Beijerinck 1912.
Actinomyces annulatus Wollenweber 1920.
Actinomyces aromaticus Krassilnikov 1941.
Hongo artrosporado Ribeyro 1919.
- (Syn.: *Actinomyces Ribeyro* Dodge 1935,
Oospora sp. Sartory 1920—1923, Stamm RIBEYRO.)
Actinomyces Bellisari Dodge 1935 vide *Streptothrix alba* Bellisari 1904.
Streptothrix buccalis Goadby 1903.
Oospora buccalis Roger, Bory et Sartory 1909.
- (Syn.: *Discomyces buccalis* Brumpt 1910,
Nocardia buccalis Castellani et Chalmers 1913,
Actinomyces buccalis Sartory et Bailly 1923.)
Actinomyces cacaoi Waksman in BUNTING 1932.
- (Syn.: *Streptomyces cacaoi* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces candidus Krassilnikov 1941.
- (Syn.: *Streptomyces candidus* Waksman 1953; non *Streptothrix candida* (Gedanensis II)
Petruschky 1898, quae est *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces casei Bernstein et Morton 1934.
- (Syn.: *Streptomyces casei* Waksman 1953.)
Streptothrix chromogena Gasperini 1891.
- (Syn.: *Cladothrix chromogena* Macé 1901,
Actinomyces chromogenes Krassilnikov 1941,
Actinomyces chromogenus Gasperini 1894 p. p.,
Oospora chromogenus Lehmann et Neumann 1896,
Actinomyces chromogenus Lachner-Sandoval 1898,
Actinomyces niger Brumpt 1927,
Actinomyces niger Krassilnikov 1949,
Streptomyces niger Waksman 1953,
Streptothrix nigra Rossi-Doria 1891,
ev. *Streptothrix nigra* Castellani 1913, ex CASTELLANI et CHALMERS 1919,
ev. *Nocardia nigra* Castellani et Chalmers 1919,
Actinomyces saprophyticus var. *chromogenus* Gasperini 1892.)
Actinomyces cinereo-niger Lieske 1921.
Actinomyces cinereus niger aromaticus Berestnev 1897.
- (Syn.: *Actinomyces cinereonigeraromaticus* Neukirch 1902,
Nocardia cinereonigra Chalmers et Christopherson 1916,
Actinomyces niger aromaticus Berestnev, ex KRASSILNIKOV 1949.)

- Actinomyces circulatus* Krassilnikov 1941.
 (Syn.: *Streptomyces circulatus* Waksman 1953.)
Actinomyces citreus Gasperini 1894.
 (Syn.: *Streptothrix citrea* Kruse 1896; non *Actinomyces citreus* Krainsky 1914, qui est *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces coremalis Krassilnikov 1949.
Actinomyces Dassonvillei Brocq-Rousseau 1907.
 (Syn.: *Nocardia Dassonvillei* Liégard et Landrieu 1911,
Discomyces Dassonvillei Brumpt 1913,
Discomyces Dassonvillei Neveu-Lemaire 1921,
Actinomyces Dassonvillei Brumpt 1927.)
Actinomyces diastaticus Krainsky 1914.
 (Syn.: *Streptomyces diastaticus* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces diastatochromogenus Krainsky 1914.
 (Syn.: *Streptomyces diastatochromogenus* Waksman et Henrici 1948.)
Cladothrix dichotoma Macé 1888.
 (Syn.: *Nocardia dichotoma* Chalmers et Christopherson 1916; non *Cladothrix dichotoma* Cohn 1875, quae est *Sphaerotilus dichotomus* Migula 1900.)
Sporotrichum Dori Beurmann et Gougerot 1906 vide *Sporotrichum* sp. Dor 1906.
Actinomyces elastica Söhngen et Fol 1914.
Actinomyces elephantis primigenii Omeljansky, ex KRASSILNIKOV 1959.
Actinomyces erythrochromogenus Krainsky 1914.
 (Syn.: *Streptomyces erythrochromogenus* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces exfoliatus Waksman et Curtis 1916.
 (Syn.: *Streptomyces exfoliatus* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces fimicarius Duché 1934.
 (Syn.: *Streptomyces fimicarius* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces flavochromogenus Krainsky 1914.
 (Syn.: *Streptomyces flavochromogenus* Waksman et Henrici 1948.)
Streptothrix Foersteri Cohn 1875.
 (Syn.: *Cladothrix Foersteri* Zopf 1882,
Cladothrix Foersteri Winter 1884,
Nocardia Foersteri Trevisan 1889,
Oospora Foersteri Sauvageau et Radais 1892,
Actinomyces Foersteri Gasperini 1894,
Discomyces Foersteri Geddoelst 1902,
Cohnistreptothrix Foersteri Pinoy 1913.)
 (Non *Streptothrix Foersteri* Gasperini 1890, quae est ev. *Streptothrix alba* Rossi-Doria 1891.)
Discomyces Gartenii Brumpt 1910.
 (Syn.: *Nocardia Gartenii* Gougerot 1913,
Nocardia Gartenii Castellani et Chalmers 1913,
Oospora Gartenii Sartory 1920—1923,
Actinomyces Gartenii Brumpt 1927,
Cladothrix liquefaciens Nr. 2 Garten 1895,
Actinomyces liquefaciens Ford 1927.)
 (Non *Cladothrix liquefaciens* Hesse 1892.)
Streptothrix gedanensis I Scheele et Petruschky 1897.
 (Syn.: *Streptothrix gedanensis* Löhlein 1909,
Nocardia gedanensis Chalmers et Christopherson 1916,
Discomyces gedanensis Brumpt 1922,
Actinomyces gedanensis Bergey 1923,

- Actinomyces gedanensis* Brumpt 1927,
Proactinomyces gedanensis Krassilnikov 1941,
Streptomyces gedanensis Müller 1950,
Streptothrix sp. Scheele et Petruschky, ex DODGE 1935.)
Actinomyces gelaticus Waksman 1923 vide *Actinomyces* sp. Nr. 104 Waksman 1919.
Actinomyces Gougeroti Duché 1934.
(Syn.: *Streptomyces Gougeroti* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces gramineus Berestnev 1897.
(Syn.: *Nocardia graminearum* Chalmers et Christopherson 1916.)
Actinomyces griseus Krainsky 1914.
(Non *Streptomyces griseus* Waksman et Henrici 1948; vgl. WAKSMAN 1959b.)
Oospora Guignardi Sauvageau et Radais 1892.
(Syn.: *Actinomyces Guignardi* Ford 1927.)
Streptothrix humifica Johan-Olsen 1897.
Cladothrix invulnerabilis Acosta et Grande Rossi 1893.
(Syn.: *Streptothrix invulnerabilis* Kruse 1896,
Actinomyces invulnerabilis Lachner-Sandoval 1898,
Nocardia invulnerabilis Chalmers et Christopherson 1916,
Actinomyces invulnerabilis Dodge 1935.)
Streptothrix lathridii Petruschky 1898.
(Syn.: *Streptothrix lathridii* Petruschky 1903, ex BALDACCI 1940,
Actinomyces lathridii Ford 1927.)
Streptothrix leuca saprophytica Foulerton et Price-Jones 1902.
(Syn.: ev. *Streptothrix leuca* Foulerton 1912,
Nocardia saprophytica Chalmers et Christopherson 1916.)
Actinomyces lieskei Duché 1934.
(Syn.: *Streptomyces Lieskei* Waksman et Henrici 1948,
ev. *Asteroides Lieskeyi* Puntoni et Leonardi 1935.)
Cladothrix liquefaciens Hesse 1892.
(Syn.: *Discomyces liquefaciens* Brumpt 1910,
Streptothrix liquefaciens Castellani et Chalmers 1913,
Nocardia liquefaciens Chalmers et Christopherson 1916,
Oospora liquefaciens Sartory 1920—1923,
Discomyces liquefaciens Neveu-Lemaire 1921,
Actinomyces liquefaciens Brumpt 1927.)
(Non *Cladothrix liquefaciens* No. 2 Garten 1895, quae est *Discomyces Garteni* Brumpt 1910.)
Actinomyces Malençonii Duché 1934.
(Syn.: *Streptomyces Malençonii* Waksman et Henrici 1948.)
Streptothrix melanotica Price-Jones 1901.
Oospora Metchnikovi Sauvageau et Radais 1892.
(Syn.: *Actinomyces Metchnikovi* Ford 1927.)
Nocardia Nicollei Delanoë 1928.
(Syn.: *Actinomyces Nicollei* Nannizzi 1934.)
Actinomyces niger aromaticus Berestnev vide *Actinomyces cinereus niger aromaticus* Berestnev 1897.
Streptothrix nigra Rossi-Doria 1891 vide *Streptothrix chromogena* Gasperini 1891.
Actinomyces nivea Krainsky, ex CHALMERS et CHRISTOPHERSON 1916.
(Non *Streptomyces niveus* Smith et al. 1956.)
Actinomyces nondiastaticus Bergey 1923 vide *Actinomyces* sp. var. *b* Bergey 1919.
Leptothrix oculorum Sorokin, ex CHALMERS et CHRISTOPHERSON 1916.
Actinomyces odoratus Krassilnikov 1941.

- Actinomyces poolensis* Taubenhaus 1918.
 (Syn.: *Streptomyces poolensis* Waksman et Henrici 1948,
 sub *Actinomyces poolensis* (Taubenhaus) Adams 1929 in KRASSILNIKOV 1949.)
Oospora pulmonalis Roger, Bory et Sartory 1909.
 (Syn.: *Discomyces pulmonalis* Brumpt 1910,
 Nocardia pulmonalis Castellani et Chalmers 1913,
 Actinomyces pulmonalis Sartory et Bailly 1923.)
Actinomyces pulmonalis Burnett 1909—1910.
 (Syn.: *Nocardia pulmonalis* Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces putrificans Nikolaieva 1915.
 (Syn.: *Streptomyces putrificans* Waksman 1953,
 Streptomyces putrificus Waksman 1957.)
Streptothrix pyogenes Chalmers et Christopherson 1916 vide *Streptothrix* sp.
 Caminiti 1907.
Actinomyces Ribeyro Dodge 1935 vide *Hongo artrosporado* Ribeyro 1919.
Actinomyces roseus Krainsky 1914.
 (Syn.: *Nocardia rosea* Chalmers et Christopherson 1916.)
 (Non *Actinomyces roseus* Namyslowsky 1912, qui vide sub nomen *Actinomyces* sp.
 Löwenstein 1910.)
Actinomyces saprophyticus var. *chromogenus* Gasperini 1892 vide *Streptothrix*
chromogena Gasperini 1891.
Streptothrix sp. Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3 Almquist 1890.
Oospora sp. Bodin 1899.
Streptothrix sp. Caminiti 1907.
 (Syn.: *Streptothrix pyogenes* Caminiti 1907, ex CHALMERS et CHRISTOPHERSON 1916,
 Actinomyces pyogenes Dodge 1935,
 Proactinomyces pyogenes Krassilnikov 1949.)
Sporotrichum sp. Dor 1906.
 (Syn.: *Sporotrichum Dori* Beurmann et Gougerot 1906,
 Discomyces Dori Beurmann et Gougerot 1909,
 Rhinocladium Dori Neveu-Lemaire 1921,
 Oospora Dori Sartory 1920—1923,
 Actinomyces Dori Brumpt 1927,
 Nocardia Dori Vuillemin 1931.)
 (Non *Oospora Doriae* Sauvageau et Radais 1892, quae est *Streptotrix alba* Rossi-
 Doria 1891.)
Actinomyces sp. Löwenstein 1910.
 (Syn.: *Actinomyces roseus* Namyslowsky 1912,
 Discomyces roseus Brumpt 1922.)
 (Non *Actinomyces roseus* Krainsky 1914.)
Oospora sp. Sartory 1920—1923 Stamm RIBEYRO vide *Hongo artrosporado*
 Ribeyro 1919.
Streptothrix sp. Scheele et Petruschky, ex DODGE 1935 vide *Streptothrix ge-*
danensis I Scheele et Petruschky 1897.
Actinomyces sp. Nr. 104 Waksman 1919.
 (Syn.: *Actinomyces gelaticus* Waksman 1923,
 Streptomyces gelaticus Waksman et Henrici 1948.)
Actinomyces sp. var. *b* Bergey 1919.
 (Syn.: *Actinomyces nondiastaticus* Bergey 1923.)
Actinomyces spinosporus Spini, ex VELICH 1914.
Streptothrix Tarozzii Miescher 1917 vide *Actinomyces albus* Tarozzi 1909.
Actinomyces tossicus Dodge 1935 vide *Actinomyces albus* var. *tossica* Rossi 1905.

Summary

Following a short discussion of the criteria, which characterize and differentiate the species, the organism *Streptomyces albus* (Rossi-Doria emend. Krainsky) Waksman et Henrici 1943 is analysed. The importance of the type-principal is emphasized. Neotype of *S. albus* is KRAINSKY'S isolation strain ATCC 618. Among the species, which formerly have been designated as synonyms of *S. albus*, only a small number can be identified either as real synonyms or as members of other taxa; most must be listed as *nomina dubia* in the *nomina rejicienda*. Among the antibiotic-producing organisms only strain Nepera 1968 could be identified as *S. albus*.

Streptomyces albus (Rossi-Doria emend. Krainsky) Waksman et Henrici. J. Bact. **46**, 339 (1943).

Type (neotype)

Streptomyces albus strain ATCC 618, isolated by KRAINSKY 1914.

Characterisation

Spores ellipsoid, $0.8-1.4 \times 0.4-0.9 \mu$ diam., smooth or slightly warty.

Aerial mycelium white, light-yellowish-white or light-grayish-white (*niveus*).

Sporophores in short closed, rarely open spirals of mostly 2—5 turns; monopodially branched, ev. with whirls.

No melanin-formation on media containing peptone and negative Tresner-Danga-reaction.

Substrate mycelium mostly yellowish-white or light-yellow, rarely yellowish-brown or light-brown.

Literatur

- ACOSTA, E., u. F. GRANDE ROSSI: Crónica méd.-quir. Habana No. 3, 1893; ref. Zbl. Bakt., Ref. **14**, 14 (1893).
 ADAMS, I. F.: Phytopathology **19**, 179 (1929).
 ALMQUIST, E.: Z. Hyg. Infekt.-Kr. **8**, 189 (1890).
 BALDACCI, E.: Boll. Sez. Ital. Soc. Internaz. Microbiol. **9**, 138 (1937).
 BALDACCI, E.: Atti Ist. Bot. Univ. Pavia, Ser. 4, **11**, 191 (1939).
 BALDACCI, E.: Mycopathologia (Den Haag) **2**, 145 (1940); **4**, 60 (1947).
 BALDACCI, E.: G. Microbiol. **6**, 10 (1958).
 BELJERINCK, M.: Folia Microbiologica **1**, 1 (1912).
 BELLISARI, G.: Ann. Ig. sperim. **14**, 467 (1904).
 BENEDICT, R. G., O. L. SHOTWELL, T. G. PRIDHAM, L. A. LINDENFELSER and W. C. HAYNES: Antibiotic. and Chemother. **4**, 653 (1954).
 BERESTNEV, N.: Aktinomykosen und ihre Erreger, Inaug. Diss., Moskau 1897; ref.: Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **24**, 708 (1898).
 BERGAMINI, L.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **165**, 122 (1956).
 BERGEY, D. H.: J. Bact. **4**, 304 (1919).
 BERGEY I—VII: BERGEY'S Manual of determinative Bacteriology 1st ed. 1923, 2nd ed. 1925, 3d ed. 1930, 4th ed. 1934, 5th ed. 1939, 6th ed. 1948, 7th ed. 1957. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

- BERNSTEIN, A., and H. E. MORTON: *J. Bact.* **27**, 625 (1934).
- BEURMANN, L., et H. GOUGEROT: *Ann. Derm. Syph. (Paris)* **IV** **7**, 993 (1906).
- BEURMANN, L., et H. GOUGEROT: *Les Nouvelles Mycoses* (1909); ref.: *BERGEY VI*, 916 (1948).
- BLANCHARD, R.: In *BOUCHARDS Traité Path. Gén.* **2**, 811 (1895).
- BODIN, E.: *Arch. Parasitol.* **2**, 362 (1899).
- BOJALIL, L. F., and J. CERBON: *J. Bact.* **78**, 852 (1959).
- BROCQ-ROUSSEAU, D.: *Recherches sur les altérations des grains des céréales et des fourrages*, Inaug. Diss. Paris 1907.
- BRUMPT, E.: *Précis Parasitol.* 1^e éd. 1910, 2^e éd. 1913, 3^e éd. 1922, 4^e éd. 1927, 5^e éd. 1936. Paris: Masson & Co.; ref.: *CIFERRI et REDAELLI* **1**, 123 (1958).
- BUNTING, R. H.: *Ann. appl. Biol.* **19**, 515 (1932).
- BURNETT, S. H.: *Ann. Rept. N. Y. State Vet. Coll.* 1909—1910, S. 167.
- CAMINITI, R.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **44**, 193 (1907).
- CASTELLANI, A., and A. J. CHALMERS: *Man. Trop. Med.*, 2nd ed. 1913, 1747 S., 3d ed. 1919, 2436 S. New York: William Wood & Co.
- CHALMERS, A. J., and J. B. CHRISTOPHERSON: *Ann. trop. Med. Parasit.* **10**, 223 (1916).
- Chicago 1958: Round-Table Conference on Taxonomy of the Actinomycetes, held at the S. A. B. Meetings in Chicago, 28. April 1958.
- CHOCHLOV, A. S., and G. S. LIBERMANN: *Abstr. of Comm. Symp. Antibiotics*, S. 154, Prag 1959.
- CIFERRI, R.: *Riv. ampelografia* **3** (1922); ref.: *BALDACCI* (1940).
- CIFERRI, R.: *Zbl. Bakt., II. Abt. Orig.* **71**, 80 (1927).
- CIFERRI, R.: *G. Microbiol.* **4**, 31 (1957).
- CIFERRI, R., e P. REDAELLI: *Bibliogr. Mycopathol.* **1**, 408 S.; **2**, 399 S., Firenze: Sansoni Antiquariato 1958.
- COHN, F.: *Beitr. Biol. Pflanzenk.* **1**, 141 (1875).
- DELANOË, P.: *Arch. Inst. Pasteur Tunis* **17**, 257 (1928).
- DODGE, C. W.: *Medical Mycology*. St. Louis: The C. V. Mosby Co. 1935.
- DOR, L.: *Presse méd.* **14**, 234 (1906).
- DUCHÉ, J.: *Encyclopédie Mycologique* **6**, *Les Actinomyces du Groupe Albus*. Paris: Paul Lechevalier et Fils 1934.
- EPPINGER, H. L.: *Beitr. path. Anat.* **9**, 287 (1891).
- ETTLINGER, L., R. CORBAZ u. R. HÜTTER: *Arch. Mikrobiol.* **31**, 326 (1958).
- FLAIG, W., u. H. J. KUTZNER: *Arch. Mikrobiol.* **35**, 105 (1960).
- FORD, W.: *Textb. Bacteriol.* Philadelphia 1927; ref.: *BERGEY VI*, 970, 971, 975 (1948).
- FOULERTON, A. G. R.: In *ALLBUTT and ROLLESTONS Syst. of Med.* **2**, 302 (1912); ref.: *BERGEY VI*, 977 (1948).
- FOULERTON, A. G. R., and C. PRICE-JONES: *Trans. path. Soc. Lond.* **53**, 56 (1902).
- GARTEN, J.: *Dtsch. Z. Chir.* **41**, 257 (1895).
- GASPERINI, G.: *Ann. micrograph. (Paris)* **2**, 462 (1890); ref.: *Zbl. Bakt., Ref.* **9**, 59 (1891).
- GASPERINI, G.: *Atti Soc. Tosc. Nat. P. V.* **7**, 267 (1891).
- GASPERINI, G.: *Ann. Ist. Ig. sperim., Univ. Roma* **2** (N. S.), 226 (1892).
- GASPERINI, G.: *Zbl. Bakt., Ref.* **15**, 684 (1894).
- GAUSE, G. F., T. P. PREOBRASHENSKAYA, E. S. KUDRINA, N. O. BLINOW, I. D. RJABOWA u. M. A. SWESCHNIKOVA: *Probleme der Klassifizierung von Actinomyceten-Antagonisten (russisch)*. Moskau: Nat. Verlag Med. Lit., Medzig 1957; Deutsche Übersetzung: *Zur Klassifizierung der Actinomyceten*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1958.
- GEDOELST, L.: *Champ. Paras. Homme Anim. Dom. Lierre et Bruxelles*: J. van Jn & H. Lamertin 1902.

- GOADBY, K. W.: *Mycology of the Mouth*. London: Langmans Green & Co. 1903; ref.: *BERGEY VI*, 923 (1948).
- GORDON, R. E., and J. M. MIHM: *J. Bact.* **73**, 15 (1957).
- GOUGEROT, H.: *Gaz. Hôp. (Paris)* **86**, 199 (1913).
- HERMANN, E. C., L. M. LARSON and W. A. PRICE: *U. S. Pat.* 2805185, 3. Sept. 1957.
- HESSE, G.: *Dtsch. Z. Chir.* **34**, 275 (1892).
- HÜTTER, R., W. KELLER-SCHIERLEIN u. H. ZÄHNER: *Arch. Mikrobiol.* (im Druck) (1961).
- INOUE, T., Y. OKAMOTO and Y. NISHIKADO: *Ber. Ohara Inst. Landw. Biol., Okayama Univ.* **11**, 95 (1959); ref.: *Chem. Abstr.* **53**, 22 256 (1959).
- International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses. Ames, Iowa: The Iowa State University Press 1958.
- JENSEN, H. L.: *Soil Sci.* **25**, 226 (1928).
- JENSEN, H. L.: *Proc. Linnean Soc. N. S. Wales* **56**, 257 (1931).
- JOHAN-OLSEN, O.: *Zbl. Bakt., II. Abt. Orig.* **3**, 273 (1897).
- KATAGIRI, K., K. SATO and S. NISHIYAMA: *Ann. Rept. Shionogi Res. Lab.* **7**, 715 (1957); ref.: *Chem. Abstr.* **32**, 13859 (1958).
- KIKUCHI, K.: *J. Antibiot., Ser. A* **8**, 145 (1955).
- KRAINSKY, A.: *Zbl. Bakt., II. Abt. Orig.* **41**, 649 (1914).
- KRASSILNIKOV, N. A.: *Bestimmungsbuch für Actinomyceten* (russisch). Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskau 1941.
- KRASSILNIKOV, N. A.: *Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten* (russisch). Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskau-Leningrad 1949; part. engl. Übersetzung durch J. B. ROUTEN. New York: Chas. Pfizer & Co. 1957; vollst. dtsh. Übersetzung aus dem VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1959.
- KRASSILNIKOV, N. A.: *J. Bact.* **79**, 65 (1960a); **79**, 75 (1960b).
- KRÜGER, F.: *Ber. Versuchsstat. Zuckerrohr West-Java Kergok-Legal* (1890); ref.: *Zbl. Bakt., Ref.* **12**, 310 (1892); vide etiam *Arb. Biol. Anst. Land- u. Forstwirtschaft. Berlin* **4**, 286 (1905).
- KRUSE, W.: In *FLÜGGES Die Mikroorganismen*, 3. Aufl. **2**, S. 48. Leipzig: F. C. W. Vogel 1896.
- LACHNER-SANDOVAL, V.: *Über Strahlenpilze*. Inaug. Diss. Straßburg, Bonn 1898.
- LEHMANN, K. B., u. R. O. NEUMANN: *Atlas und Grundriß Bakteriell.*, 1. Aufl. 1896, 2. Aufl. 1899, 3. Aufl. 1904, 4. Aufl. 1907. München: J. F. Lehmann; ref.: *CIFERRI et REDAELLI* **2**, 21 (1958).
- LIÉGARD et LANDRIEU: *Ann. d'Ocul.* **146**, 418 (1911); vgl. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **50**. Jhg., Neue Folge **14**, 117 (1912).
- LIESKE, R.: *Morph. Biol. Strahlenpilze*. Leipzig: Gebr. Bornträger 1921.
- LÖHLEIN, M.: *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* **63**, 1 (1909).
- LOMBARDO-PELLEGRINO, P.: *Rif. Med.* **19**, 1065 (1903).
- LÖWENSTEIN, A.: *Klin. Mbl. Augenheilk.* **48**. Jhg., Neue Folge **10**, 185 (1910).
- MACÉ, E.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **106**, 1622 (1888).
- MACÉ, E.: *Traité Prat. Bactériol.*, 1^e éd. 1889, 2^e éd. 1891 740 S., 3^e éd. 1897 1144 S., 4^e éd. 1901, 5^e éd. 1913, Paris.
- MACHLOWITZ, R. A., W. P. FISHER, B. S. MCKAY, A. A. TYTELL and J. CHARNEY: *Antibiot. and Chemother.* **4**, 259 (1954).
- MARSH, W. S., A. L. GARRETSON and E. M. WESEL: *Antibiot. and Chemother.* **10**, 316 (1960).
- MAYAMA, M.: *Ann. Rept. Shionogi Res. Lab.* **9**, 1185 (1959).
- MIESCHER, G.: *Arch. Derm. Syph. (Berl.)* **124**, 297 (1917).
- MIGULA, W.: *System der Bakterien* **2**. Jena: Verlag Gustav Fischer 1900.

- MILLARD, W., and S. BURR: *Ann. appl. Biol.* **13**, 580 (1926).
- MORDARSKI, M., J. WIECZOREK and T. KRZYWY: *Abstr. of Comm. Symp. Antibiotics*, S. 31. Prag 1959.
- MÜLLER, R.: *Med. Mikrobiol.*, 4. Aufl. (1950); ref.: *BERGEY VII*, 790 (1957).
- NAMYSLOWSKY, B.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **62**, 564 (1912).
- NANNIZZI, A.: *Tratt. Micopatol. Umana* **4**. Siena: S. A. Poligrafica Meini 1934.
- NEUKIRCH, H.: *Über Actinomyceten*. Inaug. Diss. Straßburg: L. Beust 1902.
- NEVEU-LEMAIRE, M.: *Précis Parasitol. Hum.*, 5. Aufl. Paris: J. Lamarre 1921.
- NIKOLAIEVA, E.: *Arch. biol. Nauk* **18**, 229 (1955).
- NOMI, R.: *J. gen. appl. Microbiol.* **5**, 180 (1960).
- OKAMI, Y.: *J. Antibiot.* **3**, 582 (1949/1950).
- OKAMI, Y., and M. SUZUKI: *J. Antibiot., Ser. A* **11**, 250 (1958).
- OSATO, T., Y. MORIKUBO, S. YAMAZAKI, T. HIKIJI, K. YANO, M. KANO, T. OSONO and H. UMEZAWA: *J. Antibiot., Ser. A* **13**, 97 (1960a).
- OSATO, T., Y. MORIKUBO and H. UMEZAWA: *J. Antibiot., Ser. A* **13**, 110 (1960b).
- OSWALD, E. J., R. J. REEDY and W. A. RANDALL: *Antibiot. Ann.* 1955/1956, S. 236.
- PETRUSCHKY, I.: *Verh. Kongr. inn. Med.* **16**, 557 (1898).
- PETRUSCHKY, I.: In *KOLLE u. WASSERMANN'S Handbuch Path. Mikroorg.* 2. Aufl., S. 832. Jena: Verlag Gustav Fischer 1903.
- PIJPER, A., and B. D. PULLINGER: *J. trop. Med. Hyg.* **30**, 153 (1927).
- PINOY, E.: *Bull. Inst. Pasteur* **11**, 929 (1913).
- PREOBRAJENSKAYA, T. P., E. S. KUDRINA, T. S. MAXIMOVA, M. A. SVESHNIKOVA u. R. V. BOYERSKAYA: *Mikrobiologija* **29**, 51 (1960).
- PREOBRAJENSKAYA, T. P., E. S. KUDRINA, M. A. SVESHNIKOVA u. T. S. MAXIMOVA: *Mikrobiologija* **28**, 623 (1959).
- PRICE-JONES, C.: *Trans. path. Soc. Lond.* **51**, 217 (1900).
- PRICE-JONES, C.: *Gen. Char. Pathol. Action Genus Streptothrix* (1901); ref.: *BERGEY VI*, 977 (1948).
- PRIDHAM, T. G., P. ANDERSON, C. FOLEY, L. A. LINDENFELSER, C. W. HESSELTINE and R. G. BENEDICT: *Antibiot. Ann.* 1956/1957, S. 947.
- PRIDHAM, T. G., C. W. HESSELTINE and R. G. BENEDICT: *Appl. Microbiol.* **6**, 52 (1958).
- PRIDHAM, T. G., and A. J. LYONS: *Bact. Proc. Soc. Amer. Bacteriologists* 1960, S. 80.
- PUNTONI, V., e D. LEONARDI: *Boll. Atti R. Acad. Med., Roma* **61**, 90 (1935).
- RAO, K. V.: *Antibiot. and Chemother.* **10**, 312 (1916).
- RIBEYRO, R. E.: *An. Fac. Med. Lima* **2**, 1 (1919).
- ROGER, H., L. BORY et A. SARTORY: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **66**, 150 (1909); vgl. *Bull. Méd. Soc. Méd. Hôp. (Paris)* **27**, 319, 326 (1909).
- ROGER, H., L. BORY et A. SARTORY: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **66**, 301 (1909).
- ROSSI, C.: *Ann. Ist. Ig. sperim., Univ. Roma* **9**, 693 (1905).
- ROSSI-DORIA, T.: *Ann. Ist. Ig. sperim., Univ. Roma* **1** (N. S.), 399 (1891).
- RULLMANN, W.: *Chem. Bakt. Untersuchungen von Zwischendeckenfüllungen*. Inaug. Diss., München 1895; ref.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Ref.* **17**, 884 (1895).
- SANFELICE, F.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **36**, 355 (1904).
- SARTORY, A.: *Champignons Paras. Homme et Animaux*, Impr. V. Arsant, Saint-Nicolas-du-Port 1920—1923.
- SARTORY, A., et A. BAILLY: *Les Mycoses pulmonaires et leurs parasites*. Paris: Clinique et Laborat. 1923.
- SAUVAUGEAU, C., et M. RADAIS: *Ann. Inst. Pasteur* **6**, 242 (1892).
- SCHEELE, I., u. I. PETRUSCHKY: *Verh. Kongr. inn. Med.* **15**, 551 (1897).
- SENECA, H., J. H. KANE and J. ROCKENBACH: *Antibiot. and Chemother.* **2**, 357 (1952).

- SHINOBU, R.: Mem. Osaka Univ. Lib. Arts & Education B. Nat. Sci. No. 7, 1 (1958).
- SMITH, C. G., A. DIETZ, W. T. SOKOLSKI and G. M. SAVAGE: Antibiot. and Chemo-ther. **6**, 135 (1956).
- SÖHNGEN, N. L., u. J. G. FOL: Zbl. Bakt., II. Abt. Orig. **40**, 87 (1914).
- SOLOVYEVA, N. K., u. S. M. RUDAYA: Antibiotiki **4**(6), 5 (1959).
- SOLOVYEVA, N. K., S. M. RUDAYA, M. M. BIČKOVA u. G. N. GINSBURG: Abstr. of Comm. Symp. Antibiotics, S. 189. Prag 1959.
- Stockholm 1958: Round-Table Conference on Streptomyces, held on the occasion of the 7th Internat. Congr. Microbiol., Stockholm 4.—5. August 1958; vgl. KÜSTER, E.: In: Int. Bull. bact. Nomencl. **9**, 15 (1959).
- TAKAHASHI, B.: J. Antibiot., Ser. A **7**, 149 (1954).
- TAKASAWA, A.: J. Antibiot., Ser. B **7**, 51 (1954); ref.: J. Antibiot., Ser. A **7**, 63 (1954).
- TAROZZI, G.: Arch. Sci. Med. **33**, 553 (1909).
- TAUBENHAUS, J. J.: J. Agr. Res. **13**, 437 (1918).
- TEBIAKINA, A. E., u. S. M. CHAIKOWSKAYA: Antibiotiki **5**(1), 26 (1960).
- Tokyo 1959: Symposium on taxonomy of Actinomycetes, held by the Society of Actinomycetes, Foundation of Microbial Chemistry, Japan Antibiotic Research Association, Tokyo 18. November 1959.
- TRESNER, H. D., and F. DANGA: J. Bact. **76**, 239 (1958).
- TRESNER, H. D., M. C. DAVIES and E. J. BACKUS: Bact. Proc. Soc. Amer. Bacteriologists 1960, S. 53.
- TREVISAN, V.: Gen. Spec. Batt., Mailand 1889, 36 S.; ref.: DE TONI et TREVISAN in SACCARDOS Syll. Fung. **8**, 928 (1889).
- TURRI, M., e L. SILVESTRI: Ann. Microbiol. **10**, 71 (1960).
- VELICH, A.: Casopis ceskych lékarur **53**, 1206 (1914); ref.: Zbl. Bakt., II. Abt. Ref. **44**, 174 (1916).
- VERNON, T. R., and M. H. DYE: New Zealand J. Agr. Res. **2**, 982 (1959); ref.: Chem. Abstr. **54**, 8997 (1960).
- VUILLEMIN, P.: Encyclopédie Mycologique **2**, Les champignons parasites et les mycoses de l'homme. Paris: P. Lechevalier et Fils 1931.
- WAKSMAN, S. A.: Soil Sci. **8**, 71 (1919).
- WAKSMAN, S. A.: In BERGEY I (1923).
- WAKSMAN, S. A.: In WAKSMAN and LECHEVALIERS Actinomycetes and Their Antibiotics, S. 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1953.
- WAKSMAN, S. A.: In BERGEY VII (1957).
- WAKSMAN, S. A.: The Actinomycetes I. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1959a.
- WAKSMAN, S. A.: Proc. nat. Acad. Sci. **45**, 1043 (1959b).
- WAKSMAN, S. A., and R. E. CURTIS: Soil Sci. **1**, 99 (1916).
- WAKSMAN, S. A., and A. T. HENRICI: J. Bact. **46**, 337 (1943).
- WAKSMAN, S. A., and A. T. HENRICI: In BERGEY VI (1948).
- WELSCH, M.: C. R. soc. belge biol. **126**, 244 (1937).
- WERKMAN, C. H.: In GAMMEL, J. A.: Arch. Derm. Syph. (Chicago) **29**, 287 (1934).
- WINTER, G.: Die Pilze in RABENHORSTS Kryptogamenflora I, Abt. 1. Leipzig: Verlag Ed. Kummer 1884.
- WOLLENWEBER, H. W.: Arb. Forsch. Kartoffelbau **2**, 1 (1920).
- WOOLDRIDGE, W. E.: Dtsch. Pat. DAS 1000966, 17. Jan. 1957.
- WOOLDRIDGE, W. E.: Brit. Pat. 828792, 24. Sept. 1960.
- ZOPF, W.: Zur Morphologie der Spaltpflanzen, Leipzig 1882.

Aus dem Institut für Angewandte Botanik der Technischen Hochschule München

Über die Besiedelung der Autolyseprodukte des Echten Hausschwamms durch Successionspilze aus der Gattung *Scopulariopsis*

I. Teil

Von

LUISE KREMPL-LAMPRECHT *

(Eingegangen am 17. Oktober 1960)

A. Problemstellung

Im Rahmen der am hiesigen Institut durchgeführten Arbeiten, die im weitesten Sinne die Physiologie des Echten Hausschwamms behandeln, konnte ich seit einer Reihe von Jahren das Verhalten dieses Pilzes in Kultur und am natürlichen Standort beobachten. Dabei wiederholten sich in auffallender Weise zwei Feststellungen immer wieder: einerseits breitet sich der Pilz bei günstigen Umweltsbedingungen in einem bestimmten Wachstumsabschnitt mit nahezu stürmischer Intensität aus und ist dabei sämtlichen Pilzkonkurrenten (von den *Phycomyceten* bis zu nahe verwandten *Basidiomyceten*) überlegen. Andererseits fällt er innerhalb kürzester Zeit der Besiedelung durch Sekundärpilze anheim, sobald Fruchtkörper oder Mycelien aus dem lebenden Verband entfernt werden, oder wenn sie bei Erreichung eines bestimmten Alters der natürlichen Autolyse unterliegen.

Bei den Untersuchungen zur Klärung dieser Erscheinungen schien anfangs die erstgenannte das lohnendere Arbeitsgebiet zu umfassen. Die erwähnte Fähigkeit des Hausschwamms, andere Pilze an ihrem Aufkommen zu hindern, ließ nämlich auf die *Bildung antibiotisch wirksamer Substanzen* schließen.

In (unveröffentlichten) Versuchen aus den Jahren 1951/53 wurde sowohl eine fungistatische als auch bakteriostatische, teilweise sogar bactericide Wirkung von Hausschwammstoffwechselprodukten nachgewiesen.

Die einleitenden Versuche waren zwar nur als „vitale Keiminhibition“ (DOLD 1953/54) zu bewerten. Diese äußerte sich darin, daß conidientragende Mycelstücke von *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* und *Cladosporium herbarum* bei ihrer Übertragung in Kolben mit 4 Wochen altem, lebendem Hausschwammmycel innerhalb von 24 Std völlig überwuchert und vom Sauerstoffzutritt abgeschnitten wurden, ohne jedoch völlig abgetötet zu werden.

* Herrn Professor Dr. R. GISTL zu seinem 70. Geburtstag in Verehrung und Dankbarkeit gewidmet.

Eine Hemmwirkung wurde aber nicht nur durch den lebenden Hausschwamm verursacht, sondern auch durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte. Nach Entfernung des Mycel enthielt die bewachsene synthetische Nährlösung noch Substanzen, die das Wachstum einer Reihe von Bakterien und Pilzen stark einschränkten bzw. unterbanden, obwohl noch ausreichend anorganische Salze und Kohlenhydrat vorhanden waren und das Maß der gebildeten Oxalsäure noch tragbar bzw. durch CaCO_3 neutralisiert war.

In einer zum damaligen Zeitpunkt (1951) erscheinenden Abhandlung von OPPERMANN über „das antibiotische Verhalten einiger holzzerstörender Basidiomyceten“ wurde in Übereinstimmung mit eigenen Versuchen die Wirkung vom lebenden Hausschwamm und vom Kulturfiltrat auf andere Mikroorganismen beschrieben.

Das bei den eigenen Versuchen 24 Std dialysierte und dann auf $\frac{1}{10}$ seines Ausgangsvolumens im Vacuum eingeeengte Kulturfiltrat zeigte je nach Zugabemenge eine Abtötung oder mehr oder minder starke Hemmung von *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Corynebacterium fascians* (?) und zwei unbestimmten Mycobakterien. Gegen 15 getestete Hefen hatte das Konzentrat der Hausschwamm-Restlösung keine Wirksamkeit.

Im Tierversuch mit weißen Mäusen ergab sich nach deren Infizierung mit Mäusetypus (*Salmonella typhi-murium*) eine deutliche antibiotische Wirkung des verwendeten Konzentrats. Die Ausstrichplatten von Herz, Leber und Milz der infizierten Mäuse waren nach Verfütterung des Konzentrats teilweise bereits frei von Mäusetypus. Die Versuche wurden nicht mehr fortgesetzt, da einerseits starke toxische Wirkungen auf die Versuchstiere auftraten in Form von Ekzemen und Vergrößerung innerer Organe, vor allem der Milz, andererseits weitere Untersuchungen weniger mikrobiologische Probleme, als vielmehr medizinische oder chemische berührten.

Von nicht geringerem Interesse als die Bildung antibiotisch wirksamer Substanzen durch den Hausschwamm ist die eingangs erwähnte andere Beobachtung, nämlich die *Besiedelung abgestorbenen Hausschwammmycel durch Successionspilze*.

Trotz Standortsverschiedenheiten einzelner Hausschwammstämme (LAMPRECHT 1958) und Jahreszeitenwechsel entsprechen die jeweils auftretenden Zweitbesiedler mit großer Konstanz den verschiedenen Abbauphasen von Hausschwammfruchtkörper und -mycel. Dabei löst eine Gesellschaft dieser Folgeorganismen die andere ab und führt langsam einen natürlichen Abbau fort, solange neben verwertbaren organischen und anorganischen Resten die nötigen Feuchtigkeitsbedingungen vorhanden sind. Diese charakteristischen Successionen im Verlaufe der Autolyse und des Abbaues entstehen durch das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Organismengruppen gegenüber den Autolyseprodukten des Hausschwamms, die einschränkende Wachstumsgrenzen (in bezug auf Verwertbarkeit, pH -Wert usw.) schaffen.

B. Gegenüberstellung der Autolyse in verschiedenen pH -Bereichen

Um diese Sekundärpilze mit ihren typischen Eigenschaften genauer untersuchen zu können, war es nötig, zuerst den biologischen Ablauf der

Autolyse des Hausschwamms und die dabei entstehenden Substanzen zu ermitteln, die als Nährstoffe für die Zweitbesiedler in Frage kommen, seien es nun Bestandteile des Plasmas oder der Membran bzw. deren Abbauprodukte.

Von maßgeblicher Bedeutung bei diesen Untersuchungen war, ob es sich um Untersuchungsmaterial aus Kulturen oder um solches vom natürlichen Standort handelte. Im ersten Fall kam es immer zur sogenannten sauren Autolyse, im anderen meistens zu einer alkalischen, wenn nicht Mycel und Fruchtkörper schon vorher abgetrocknet waren.

Den grundsätzlichen Unterschied zwischen „saurer und alkalischer Autolyse“ hat BEHR (1930) beschrieben. Bei Untersuchungen an *Aspergillus niger* hatte er festgestellt, daß bei saurer Autolyse der Abbau nicht so tiefgreifend, sondern gewissermaßen in seinem Fortschritt bis zur NH_3 -Bildung gehemmt ist. Unter Übernahme der bei BEHR ausführlich beschriebenen Methodik wurden die nachfolgenden Werte ermittelt.

1. Saure Autolyse von Merulius bei Kultur auf synthetischer Nährlösung

Bei diesem Versuch war es gleichgültig, ob physiologisch saure Salze, [nämlich NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$] oder physiologisch alkalische Salze [NaNO_3 , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$] verabreicht wurden. Der pH -Wert sank ausnahmslos bis auf etwa 2 (manchmal noch tiefer) und stieg vereinzelt nach längerer Kulturdauer geringfügig bis etwa 2,5 wieder an. Obwohl makroskopisch in der Zeit bis zur völligen Eintrocknung keine besonderen Veränderungen sichtbar waren, fand ein vor allem das Plasma betreffender Abbau statt. Dies ergibt sich aus den in Tab. 1 aufgezeichneten Versuchsergebnissen, besonders aus den *Bestimmungen der Chitinmenge nach verschiedenen Zeitabschnitten*.

Zu den angegebenen Zeiten wurden von jeweils 30 Kulturkolben 25 für die Chitinerstellung verwendet, 2 Kolben dienten für die pH -Messung, 2 für die NH_4 -Bestimmung in der Nährlösung und 1 Kolben für den qualitativen Nachweis organischer N-Verbindungen (Ninhydrinprobe) in der Nährlösung. Das anfallende Mycel aus den 5 letztgenannten Kolben wurde zu gleichen Teilen zur Ermittlung des Myceltrockengewichts und des N-Gehalts im Mycel verwendet.

Nach etwa 15 Tagen setzen bei bestem Mycelzuwachs autolytische Vorgänge ein. Die Stickstoffmenge im Mycel nimmt absolut bis zu etwa 50 Tagen zu und sinkt dann langsam, prozentual (auf das Trockenmycelgewicht bezogen) jedoch sinkt sie von Anfang an stetig.

Einen tieferen Aufschluß über die Autolyse ergeben die N-Werte jedoch erst, wenn man den auf das Chitin entfallenden N-Anteil dazu in Beziehung setzt. Nach 25 Tagen bestehen 17,3% der Trockensubstanz

aus Chitin¹. Bezogen auf eine Gesamt-N-Menge von 3,48 mg im Mycel macht also der Anteil des Chitin-N mit 0,755 mg 21,8% aus. Dies entspricht etwa den normalen Verhältnissen im Hausschwammmycel. Unter Berücksichtigung der geringfügigen Abnahme von Mycel und Chitinmenge gegen Ende der 100tägigen Kulturperiode zeigt die Beziehung zwischen Mycel-Gesamtstickstoff und Chitin-Stickstoff deutlich

Tabelle 1. Saure Autolyse auf synthetischer Nährlösung [mit 0,05 mol (NH₄)₂SO₄]

Alter (Tage)	pH	NH ₄ - Stickstoff in der Nähr- lösung mg	N-Gehalt des Mycels mg	Amino- säuren in der Nähr- lösung (Nin- hydrin)	Auto- lyse-N mg	Mycel- trocken- gewicht (17110°) mg	Chitin- gehalt (% des Mycel- gewichtes) mg	Anteil des Chitin-N am Gesamt-N mg
0	6	18,04						
5	5,39	17,95	1	—	—	10	×	×
							(nicht bestimmt)	
10	5,01	17,12	1	—	—	12,5	×	×
15	3,02	16,28	1,75 (7,3%)	+	(0,01)	24	×	×
				sehr schwach				
20	2,9	14,20	2,49 (5,95%)	+	(1,35)	43	×	×
25	2,36	11,88	3,48 (5,2%)	+++	(2,68)	67	11,6 (17,3%)	0,755 (21,8%)
30	2,02	11,56	4,07 (4,85%)	+++	(2,42)	84	×	×
50	2,38	12,79	4,12 (4,5%)	+++	(1,13)	92	21,1 (22,9%)	1,37 (33,2%)
75	2,5	12,94	3,29 (4,33%)	+++	(1,81)	76	18 (23,7%)	1,17 (35,5%)
100	ein- ge- trock- net	—	2,87 (3,55%)	—	—	81	17,7 (21,8%)	1,15 (40%)

den Effekt der Autolyse: während der Chitin-N-Anteil nach 25 Tagen etwa ein Fünftel darstellte, nimmt er nach 100 Tagen scheinbar das Doppelte ein. Dieser Eindruck entsteht dadurch, daß hier durch die *vor allem das Plasma betreffende Autolyse* nur mehr ein Teil des Eiweiß-Stickstoffes im Mycel erscheint, und so das Verhältnis von Mycel-Stickstoff/Chitinstickstoff stark verändert. Der stark positive Ausfall der

¹ Dieser Prozentsatz ist ziemlich hoch, wenn man die Angaben von SCHOLL (1908) damit vergleicht, der für *Boletus edulis* nur etwa 5—6% der lufttrockenen (!) Pilzmasse als Chitin angab. PRINGSHEIM u. KRÜGER (1932) nahmen an, daß das Chitin nur einen geringen Teil der Zellwand, nur eine Art „Inkrustation“ darstellt, da der Gesamtanteil der Zellwandsubstanz bei höheren Pilzen zwischen 20—45% liegt.

Ninhydrinprobe bestätigt die Anhäufung von Eiweißprodukten in der Nährlösung. Den Hauptanteil stellen verschiedene Aminosäuren dar, daneben sind wahrscheinlich auch noch größere Eiweißbausteine wie Peptide und Peptone vorhanden.

Wie bereits frühere papierchromatographische Untersuchungen (GÖTTING, LAMPRECHT u. HILDINGER 1958) gezeigt haben, enthält das Hausschwammprotein 12–15 Aminosäuren, deren Menge je nach Herkunft des Ausgangsmaterials (natürliches Mycel, natürliche Fruchtkörper oder Kulturmycel) wechselt. Den Hauptbestandteil macht immer die Glutaminsäure aus mit Werten bis maximal 5,4% des Gesamteiweißes. Es folgen mit relativ hohen Anteilen Threonin, Valin und Methionin bei Fruchtkörper und natürlichem Luftmycel, während bei Kulturmycel Asparaginsäure, Leucin und Alanin, Glycin und Phenylalanin sich anschließen. Geringere Mengen entfallen auf Serin, Lysin, Tryptophan, Histidin, Prolin und Cystin.

In der Nährlösung, auf der der Hausschwamm 7 Wochen kultiviert worden war, ließen sich analog zum Mycelhydrolysat alle Komponenten wiederfinden, ausgenommen Lysin. Dabei fiel auf, daß der auf einfach gebaute Aminosäuren entfallende Prozentsatz etwa um $\frac{1}{3}$ zugenommen hatte, daß auch Methionin wieder vorhanden war und außerdem Amide, nämlich sicher Asparagin und wahrscheinlich Harnstoff.

Die Zunahme der NH_4^+ -Menge in der Nährlösung bei den Messungen nach 50 und 75 Tagen unter gleichzeitigem, geringem Steigen des pH -Wertes läßt ein geringes Austreten von bisher im Mycel gespeichertem NH_4^+ möglich erscheinen.

2. Alkalische Autolyse

Sie läßt sich vor allem an den Fruchtkörpern des Echten Hausschwammes am natürlichen Standort beobachten. Ihr Beginn äußert sich darin, daß erheblich mehr Flüssigkeitstropfen austreten als gewöhnlich, anfangs farblos, bald aber hell- bis dunkelbraun werdend. Der pH -Wert zwischen 8 und 8,5 läßt darauf schließen, daß sich NH_3 bei der einsetzenden alkalischen Autolyse bildet und in den Tropfen löst.

Zur Aufzeichnung des Ablaufs einer alkalischen Autolyse wurden Fruchtkörper oder Mycelien mit beginnender Fruchtkörperbildung verschiedener Standorte in feuchten Kammern ausgelegt und die einzelnen Abbaustufen beobachtet.

Die erste Abbauphase war auch hier durch die Entwicklung großer Mengen von NH_3 charakterisiert, so daß der ganze Dampfraum der Schalen über dem autolysierenden Material davon erfüllt war. Die vorhandenen Flüssigkeitstropfen gaben stark positiven Ausfall auf Zusatz von Neßler's Reagens. Nach der Phase der NH_3 -Abgabe machte sich ein allmählich immer deutlicher werdender Geruch nach Aminen bemerkbar.

Gleichzeitig war die Mycelmenge auf einen Bruchteil der Ausgangsmasse zusammengeschrumpft und eine große Menge dunkelbrauner Flüssigkeit in die Schale ausgetreten.

Um genaueren Aufschluß über die ausgeprägten Auslesebedingungen zu erhalten, die durch diese Abbausubstanzen nach alkalischer Autolyse für die Sekundärbesiedler entstehen, wurde das vorhandene Gemisch auf seine einzelnen Aminbestandteile untersucht.

2a) Aminbestimmung

Dazu wurde die Autolyseflüssigkeit vom Pilzmaterial filtriert und mit 5% HCl versetzt, um die Amine als Chlorhydrate zu binden. Die Menge der nach dem Eindampfen erhaltenen Trockensubstanz aus der Autolyseflüssigkeit schwankte zwischen 2,3% und 10% des Mycelfrischgewichtes, je nach Art (Mycel oder Fruchtkörper) und Herkunft des Pilzmaterials. Neben einem Hauptanteil wasserlöslicher Substanzen enthielt der Eindampfrückstand auch wasserunlösliche Bestandteile in

Tabelle 2. Bestimmung der Abbausubstanzen nach alkalischer Autolyse

	Mycel	Mycel und Fruchtkörper	Fruchtkörper
Frischgewicht	30 g	37 g	21,5 g
Eindampfrückstand des Autolysats	2 g	2,5 g	0,5 g
wasserunlöslicher Anteil davon	10%	15%	12%
Gesamtstickstoff (Gew.-% der Trockenmasse), davon entfallen	14%	17%	15%
auf Methylamin-N	7,4%	3,4%	4,5%
auf Dimethylamin-N	6,6%	13,6%	10,5%

(Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes erfolgte nach KJELDAHL, die Bestimmung des primären Stickstoffes nach VAN SLYKE.)

Mengen zwischen 10 und 15%. Die Reaktionen (mit Bromphenolblau und Trichloressigsäure) auf höhere Amine im wasserlöslichen Anteil fielen negativ aus, es fehlten im Autolysat also höhere Amine, an deren mögliches Vorhandensein gedacht worden war, etwa Amylamin oder Tryptamin usw. Dagegen gab der wasserlösliche Anteil bei Fruchtkörperautolysat eine schwach positive Ninhydrinreaktion, also den Hinweis auf noch nicht völlig autolytierte Eiweißbausteine wie Aminosäuren.

Im wasserunlöslichen Anteil waren möglicherweise noch geringe Mengen höhermolekularer N-Verbindungen aus dem Autolysat vorhanden. Da jedoch die Menge des Gesamtstickstoffes (nach KJELDAHL) dem Anteil der wasserdampfgefährlichen Amine fast völlig entsprach, konnte die im wasserunlöslichen Anteil vorliegende geringe N-Menge vernachlässigt werden.

Wie Tab. 2 zeigt, setzte sich die vorhandene N-Menge aus wechselnden Anteilen von Methylamin und Dimethylamin zusammen; tertiärer N fehlte, Trimethylamin war also nicht unter den Autolyseprodukten.

Aus den in Tab. 2 angegebenen Werten für die im Methylamin bzw. Dimethylamin vorliegenden Stickstoffmengen läßt sich rechnerisch ein Bild der Zusammensetzung des autolytierten Materials ermitteln:

(z. B.: 7,4% primären Stickstoffs entsprechen

$$\frac{7,4 \cdot 67,5 \text{ (M. G. von Methylamin)}}{14 \text{ (A. G. Stickstoff)}} = 35,7 \% \text{ Methylamin).}$$

Bei Mycelautolysat

entfallen 35,7% auf Methylamin und 38,4% auf Dimethylamin.

Im Autolysat von Mycel mit beginnender Fruchtkörperbildung entfallen 16,4% auf Methylamin und 79,1% auf Dimethylamin.

Im Autolysat von Fruchtkörper allein

entfallen 21,7% auf Methylamin und 61,1% auf Dimethylamin.

Es ist zu berücksichtigen, daß vor dem Freiwerden der Amine eine mehr oder minder große Menge NH_3 sich gebildet hatte, die hier nicht erfaßt wurde.

Zur Kontrolle der bisher angegebenen Werte wurde von Strang- und Luftmycel mit kleineren Fruchtkörpern sowohl die Autolyseflüssigkeit als auch die restliche Pilzmasse analysiert. Bei einem Gesamtgewicht von 52,7 g entfielen auf die Trockenmasse 26,3 g; der wasserlösliche Anteil umfaßte 77,7%, der Rest war wasserunlöslich. Der wasserlösliche Anteil war auch hier frei von höheren Aminen. Vom wasserunlöslichen Anteil (der hier also noch die restliche Pilzmasse enthielt!) wurde der Gesamt-N, der wahrscheinlich aus höhermolekularen Eiweißbausteinen, Amiden usw. besteht, mit 5,07% ermittelt. Der N-Anteil der flüchtigen Amine beträgt 12,75% der Trockenmasse, davon entfallen 2,55% auf Methylamin-N und 10,2% auf Dimethylamin-N. Bezieht man diese N-Anteile wiederum auf die Trockenmasse, so entfallen hier 12,3% auf Methylamin und 59,2% auf Dimethylamin.

2b) Chitinbestimmung

In gleicher Weise wie bei der Aufzeichnung der sauren Autolyse sollte auch hier eine Chitinbestimmung darüber Aufschluß geben, welche Zellbestandteile hauptsächlich der hier rascher verlaufenden Autolyse unterliegen. Dazu wurden Mycelmengen gleichen Ausgangsgewichtes im Frischzustand, nach fünftägiger Autolyse und nach 25tägigem Abbau analysiert.

Im Frischzustand umfaßte der Chitinanteil 19,6% des Trockengewichts (Mittelwert aus sechs Proben). Nach 5 Tagen Autolyse in der feuchten Kammer betrug der noch faßbare Chitinanteil der gleich großen Mycelausgangsmenge nur noch 16,1%. Dies besagt, daß die inzwischen stattgefundene NH_3 -Entwicklung nicht nur auf den Abbau des Plasmas, sondern auch auf den der Zellwände zurückzuführen ist. Nach 25 Tagen, innerhalb derer Verflüssigung mit Aminentwicklung stattgefunden hatte, war der Anteil des Chitins auf 11% gesunken (vgl. saure Autolyse mit 17,3% Chitin nach 25 Tagen).

Wie stark bei der alkalischen Autolyse die Zellwandsubstanzen sofort in den Abbau mit einbezogen werden, zeigt noch deutlicher eine Gegenüberstellung der tatsächlich gewogenen Chitinmengen. Dem Ausgangsmaterial von 4,5 g Trockensubstanz entsprachen: Im Frischzustand

882 mg, nach 5 Tagen 725 mg, nach 25 Tagen 495 mg Chitin. *Nur mehr 56% der Ausgangsmenge sind also noch vorhanden, die restlichen 44% Chitin wurden innerhalb von 25 Tagen abgebaut.*

Für die Tatsache, daß auch die Eiweißsubstanzen hier einem raschen und gründlichen Zerfall, wahrscheinlich bis zum NH_3 , unterliegen, spricht, daß in der Autolyseflüssigkeit (nach der Entfernung der NH_4 -Komponente) eine Ninhydrinreaktion auf Aminosäuren nicht oder nur mehr spurenhaf vorhanden war.

Mit den hier geschilderten Untersuchungen über die Autolyse des Hausschwamms und die dabei entstehenden Produkte, waren die wichtigsten Aufschlüsse über Art und Herkunft der Substanzen gewonnen, die den Sekundärbesiedlern als Nährstoffe zur Verfügung stehen. Während die nach saurer Autolyse hauptsächlich vorliegenden Aminosäuren und Amide für die meisten Pilze gut verwertbare N-Quellen sind, schafft vor allem das Auftreten von Aminen nach alkalischer Autolyse erheblich ungünstigere Wachstumsbedingungen. Darüber hinaus führt die Verschiebung des pH -Wertes in das alkalische Gebiet für Pilze zu extremen Bedingungen.

C. Registrierung der Successionspilze

Wie die Zählung und die Bestimmung der vorgefundenen Folgebesiedler zeigte, wirken sich die Unterschiede deutlich auf die Zusammensetzung der Successionsgesellschaften aus, so daß es möglich ist, zwei verschiedene Gruppen von Pilzen gegenüberzustellen, je nachdem, ob der Hausschwamm einer sauren (\rightarrow Gruppe A) oder einer alkalischen Autolyse unterlag (\rightarrow Gruppe B).

Bei Gruppe A (Tab. 3) wurden diejenigen Pilze erfaßt, die im Verlauf mehrerer Jahre von eingetrockneten Hausschwammycelien (bzw. den davon befallenen Baustoffen) isoliert worden waren. Offensichtlich war dabei das Mycel am natürlichen Standort eingetrocknet, so daß stark abbauende Fermente nicht zur Wirkung kamen. Als es dann später von außen her wieder feucht, d.h. besiedelbar, wurde, dürften den Folgebesiedlern, in ähnlicher Weise wie nach saurer Autolyse von Kulturmycel, Aminosäuren zur Verfügung gestanden haben.

Die hier angeführten 18 Gattungen waren regelmäßig durch die gleichen Arten vertreten, so daß sie als eine Art „Leitorganismen“ nach saurer Autolyse aufgefaßt wurden.

Mit einer Auswahl aus der beschriebenen Pilzgemeinschaft, nämlich mit den fünf am meisten vorkommenden Gattungen (*Aspergillus*, *Citromyces*, *Cladosporium*, *Penicillium* und *Verticillium*), wurde noch ein Kontrollversuch angestellt, bei dem die Stickstoffquelle einer Czapek-Lösung ersetzt war durch sog. „Hausschwammrestlösung“. Es handelte sich dabei um die synthetische Nährlösung, auf der Hausschwamm 2 Monate kultiviert worden war, aber ohne die gebildeten Hemmstoffe. Zur Entfernung dieser fungistatisch wirkenden Stoffwechselprodukte wurde die

Lösung dialysiert und das Dialysewasser, das die als erste Autolyseprodukte gebildeten, einfachen Aminosäuren enthielt, wiederum konzentriert. Diese wenn auch

Tabelle 3. Übersicht über Successionspilze der Gruppe A auf *Merulius lacrymans*

<i>Absidia glauca</i>	1×	<i>Fusarium culmorum</i> (?)	1×
<i>Acremoniella</i> spec.	1	<i>Fusarium oxysporum</i>	1×
<i>Aspergillus candidus</i>	2×	<i>Lachnella</i> spec.	1×
<i>Aspergillus flavus</i>	11×	<i>Mucor hiemalis</i>	1×
<i>Aspergillus glaucus</i>	etwa 25—30×	<i>Mucor plumbeus</i>	6×
(mit Perithecien)	2×	<i>Mucor racemosus</i>	8—10×
<i>Aspergillus nidulans</i>	2×	<i>Mucor</i> spec.	2×
<i>Aspergillus niger</i>	10—12×	<i>Neurospora sitophila</i>	4×
<i>Aspergillus rufescens</i> (?)	1×	<i>Paecilomyces</i> spec.	3—5×
<i>Aspergillus sydowi</i>	1×	<i>Penicillium glaucum</i>	etwa 40—50×
<i>Blastotrichum</i> spec.	1×	<i>Penicillium</i>	
<i>Botrytis cinerea</i>	18×	<i>brevicompectum</i>	etwa 40—50×
<i>Cephalosporium</i>		<i>Penicillium crustaceum</i>	etwa 40—50×
<i>acremonium</i>	7×	<i>Penicillium</i>	
<i>Cephalosporium</i> spec.	7×	<i>glauco-griseum</i>	etwa 40—50×
<i>Citromyces glaber</i>	12×	3 <i>Penicillium</i> -Arten	
<i>Cladosporium cellare</i>	2×	(nicht bestimmbar)	40—50×
<i>Cladosporium fumago</i>	2×	<i>Rhizopus nigricans</i>	17×
<i>Cladosporium herbarum</i>	etwa 40×	<i>Trichothecium roseum</i>	3×
<i>Cylindrocarpon</i> spec.	1×	<i>Verticillium glaucum</i>	14×
		<i>Verticillium</i> spec.	4×

Tabelle 4. Übersicht über Successionspilze der Gruppe B

<i>Alternaria-Stemphylium</i>	3×	<i>Penicillium</i> spec.	3×
<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Rhizopus nigricans</i>	7×
<i>Aspergillus glaucus</i>	etwa 6—8×	<i>Sepedonium chrysospermum</i>	4×
<i>Aspergillus niger</i>		<i>Scopulariopsis</i> spec.	23×
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3×	<i>Sporotrichum carnis</i> (?)	3×
3 verschiedene, nicht bestimmbare <i>Aspergillus</i> -Arten	1×	<i>Sporotrichum chrysospermum</i>	1×
<i>Botrytis</i> spec.	2×	<i>Sporotrichum grisellum</i>	2×
<i>Chaetomium indicum</i>	2×	<i>Stachybotrys lobulata</i>	1×
<i>Chaetomium globosum</i>	1×	<i>Stemphylium botryosum</i>	3×
<i>Chaetomium murorum</i>	1×	<i>Stysanus stemonites</i>	2×
<i>Cladobotryum</i> spec. weiß	3×	<i>Tilachlidium</i> spec.	2×
<i>Cladobotryum</i> spec. grau-schwarz	11×	<i>Trichoderma</i> spec (?)	1×
<i>Dendrosporium</i> spec.	1×	<i>Verticillium affine</i>	7×
<i>Gliocladium</i> spec.	4×	<i>Verticillium</i>	
<i>Mucor racemosus</i>	6×	<i>agaricinum</i> (?)	1×
<i>Neurospora sitophila</i> (mit schwarzen Perithecien)	1×	<i>Verticillium cinnabarinum</i> (?)	1×

dürftige Stickstoffversorgung reichte aus, um ein mäßig gutes Wachstum der fünf Testgattungen zu ermöglichen.

Die Successionspilze der Gruppe B (Tab.4), die für eine neutrale bis alkalische Autolyse charakteristisch sind, wurden sämtlich von Hausschwammfruchtkörpern isoliert, die schon am natürlichen Standort in verschiedenen Stadien der Zersetzung waren, teilweise unter Entwicklung sehr unangenehmer Gerüche. Im Gegensatz zur Folgeassoziation A waren die hier isolierten Pilze fast alle in der Rohkultur stark mit Bakterien untermischt. Während durch die hohe Wasserstoffionen-Konzentration nach saurer Autolyse das Bakterienwachstum unterdrückt wird, kommen nach alkalischer Autolyse die Umweltbedingungen einem solchen sehr entgegen, so daß Bakterien als die erste Folgegesellschaft auftreten, an die sich erst nach einiger Zeit die der Pilze anschließt.

Die Pilzsuccessionsgesellschaft selbst ist hier völlig verschieden von der nach saurer Autolyse. Sie setzt sich größtenteils aus mehr oder minder zufälligen Einzelarten zusammen, nur eine Gattung wurde immer wieder und in zahlreichen Arten gefunden, nämlich die Gattung *Scopulariopsis*.

Der Gattung *Scopulariopsis* galt daher das besondere Interesse, einerseits wegen ihrer bekannten Fähigkeit zur Bildung flüchtiger organischer (unter Umständen giftiger) Verbindungen mit Arsen oder verwandten Elementen, andererseits, weil sich hierdurch vielleicht eine Möglichkeit bot, die in der älteren Hausschwammliteratur des öfteren erwähnten „gesundheitsschädigenden“ Eigenschaften des Hausschwamms zu erklären.

Nach GOEPPERT-POLECK (1885) soll z.B. „der widrige Geruch des Hausschwammes Kopfschmerzen, Schwindel und nervöse Zustände“ herbeiführen können. Auch MEZ (1908) führt an, daß gerade die sehr eiweißreichen Fruchtkörper bei ihrer Fäulnis einen „pestilenzialischen Gestank“ verbreiten. Versuche von GOTTSCHLICH (1895) hingegen hatten gezeigt, daß weder giftige noch andersartige Gase als bei gewöhnlicher Eiweißfäulnis entstehen.

Nirgends ist aber die Tatsache erwähnt, daß besonders Fruchtkörper fast unmittelbar nach Einsetzen der Autolyse von zahlreichen Folgeorganismen besiedelt werden und daß der Abbau der hier noch vorhandenen Nährstoffe nicht selten mit der Entwicklung charakteristisch riechender Verbindungen gekoppelt ist. Nach eigenen Beobachtungen läßt sich der entstehende Geruch am häufigsten mit dem von verschiedenen Lauchölkomponenten vergleichen, z.B. mit Methylmercaptan ($\text{CH}_3 \cdot \text{SH}$, Geruch nach faulem Kohl) oder mit organischen Sulfiden wie Dialkylsulfiden (Geruch nach Meerrettich). Daneben entwickelten sich manchmal auch flüchtige Verbindungen mit mehr knoblauchartigem Geruchscharakter; vereinzelt trat typischer Phosphingeruch auf¹, seltener ein penetrant käsiger Geruch.

¹ Er wurde freundlicherweise von mehreren erfahrenen Chemikern unabhängig voneinander dem Geruch nach identifiziert.

D. Spezielle Untersuchungen mit den *Scopulariopsis*-Folgestämmen

Nach THOM u. RAPER (1949) sind *Scopulariopsis*-Arten aktiver im Abbau stickstoffhaltiger Bestandteile der besiedelten Stoffe als etwa die *Penicillium*-Verwandtschaft. Häufig treten sie daher als Begleiter der Zerstörung zu einem Zeitpunkt auf, nach dem die Penicillien ihre Tätigkeit eingestellt haben, also bei fortgeschrittenen Stadien von Abbauprozessen. Diese zeitliche Aufeinanderfolge von *Penicillium*- und *Scopulariopsis*-Arten wurde bei der Autolyse der holzzerstörenden Pilze nicht beobachtet; wie bereits erwähnt, verlaufen hier, entsprechend den zwei Autolyse-Typen, die beiden Successionsbesiedelungen nebeneinander.

1. Der p_H -Wert als Auslesefaktor

Im Gegensatz zu den gewöhnlichen Schimmelpilzen sind die meisten *Scopulariopsis*-Arten fähig, Nährmedien mit neutraler bis alkalischer Reaktion zu besiedeln, worauf schon THOM (1930), HENNEBERG u. KNIEFALL (1932), ZACH (1934), LEMBKE (1943) sowie THOM u. RAPER (1949) hinwiesen, während sie z. B. auf Malzagar, einem sonst sehr guten Nährboden, wegen des niederen p_H -Wertes nur dürftig gedeihen.

Zur Ermittlung des p_H -Einflusses auf das Wachstum wurden 10 *Scopulariopsis*-Stämme, die von verschiedenen Hausschwammfruchtkörpern stammten (abgekürzt = HFK), auf Haferflockennährböden und modifizierter Henneberg-Lösung gezogen, der p_H -Gang aufgezeichnet und nach 3 Wochen das Erntetrockengewicht bestimmt.

Dieser Orientierungsversuch erbrachte folgendes Gesamtbild: Der optimale p_H -Wert lag für die braunen Stämme zwischen 7 und 8, die Wachstumsgrenzen bei etwa p_H 4 und 9. Für die weißlichen Stämme lag das Optimum zwischen 7 und 7,5. Diese optimalen p_H -Zonen mußten bei der Kultivierung und Beobachtung auf verschiedenartigen Nährböden, die nun mit allen isolierten *Scopulariopsis*-Stämmen durchgeführt wurden, berücksichtigt werden.

Zum Zwecke einer systematischen Bestimmung, vor allem aber einer berechtigten Aufgliederung der Gattung *Scopulariopsis* in zusammengehörige Gruppen bedarf es nämlich einer Trennungsmöglichkeit zwischen den oft sehr schwach ausgeprägten Artcharakteristica und den nicht selten sehr stark sich auswirkenden nährbodenbedingten Erscheinungsformen. Um verwandtschaftliche Beziehungen der *Scopulariopsis*-Arten untereinander mit der vorhandenen Nomenklatur in Einklang zu bringen, wäre es nach THOM u. RAPER nötig, alle heute erhältlichen Arten auf den verschiedensten Nährböden zu beobachten, denn nur so lassen sich die Wirkungen veränderter Kulturbedingungen ausschalten, wie sie bei einigen Originalbeschreibungen vorliegen.

2. Beschreibung und Bestimmung der *Scopulariopsis*-Folgestämme

a) Das makroskopische Erscheinungsbild, betreffend Wachstumsgeschwindigkeit und -intensität, Farbe von Mycel und Conidien, Oberflächenstruktur, Randform und etwaige Zonenbildung der Kolonien, Exsudat, Knötchenbildung. b) Das mikroskopische Bild, wie Bau der Conidienträger, Form und Maße der Conidienketten, der Einzelconidien und Disjunktoren (Konnektive); wenn vorhanden auch der Ascocarpe mit Asci und Ascosporen und der sklerotienähnlichen Mycelpolster. Letzteres wurde sowohl durch Zeichnung als auch durch Mikro-Photo festgehalten. (Eine genauere Charakterisierung dieser Stämme wird in einer folgenden Arbeit gegeben.)

c) Zur Bestimmung der Folge-*Scopulariopsis*-Arten dienten die zusammengefaßten Beschreibungen von THOM (1930) und die Systematik mit Gruppeneinteilung nach RAPER u. THOM (1949); ferner eine Reihe von Originalbeschreibungen einzelner *Scopulariopsis*-Arten¹. Darüber hinaus wurden zum morphologischen Vergleich 25 Originalstämme aus dem Centraalbureau für Schimmeldkulturen in Baarn herangezogen. Die Artbestimmung der Successionsstämme brachte das in Tab. 5 niedergelegte Ergebnis.

Die Bestimmung der *Scopulariopsis*-Folgestämme zeigte also, daß diese am häufigsten auftretende Gattung nur mit relativ wenigen Arten vorkommt.

Es erhob sich daher die Frage, ob bei den Folgestämmen eine besonders ausgeprägte Anpassung vorliege, wobei gewisse Fähigkeiten sichtbar werden müßten, die auf anderem Nährmaterial oder bei anderen Arten dieser Gattung nicht in Erscheinung treten. Dazu könnte z. B. die Fähigkeit zum Chitinabbau gehören, die vom gebotenen Nährboden abhängig sein kann, wie von HUBER (1958) gezeigt wurde. Bei seinen Untersuchungen mit insektentötenden, chitinabbauenden Pilzen hatte er z. B. festgestellt, daß hier die Fähigkeit zur Chitinauflösung adaptiv ist und daß zusätzlich gereichte N- und C-Quellen einen Angriff auf das Chitin hintanhaltend. Da die bisher einzige Prüfung über den Chitinabbau durch eine *Scopulariopsis*-Art (BUCHERER 1935) negativ verlief, schien es lohnend, das Verhalten der Folgestämme nochmals zu kontrollieren, wenn ihnen Chitin als C- oder als N-Quelle geboten wird. Ein positives Ergebnis würde bedeuten, daß ihnen am natürlichen Standort nicht nur Chitin als besiedelbare Substanz zur Verfügung steht, sondern daß sie dadurch gleichzeitig auch zu Eiweißkomponenten der Hausschwammmycelien Zutritt erlangen könnten, bevor diese bis zum NH_3 abgebaut werden.

¹ Bestimmungsliteratur in der Schrifttumsangabe mit * gekennzeichnet.

Tabelle 5. Die *Scopulariopsis*-Folgearten

Stamm		Conidienmaß
HFK 1	<i>Scop. brevicaulis</i> (Bainier)	6,43 · 6,3 μ
HFK 2	<i>Scop. brevicaulis</i> var. <i>glabra</i>	6,04 · 5,24 μ
HFK 3	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	6,46 · 5,76 μ
HFK 4	<i>Scop. brevicaulis</i> var. <i>glabra</i>	5,98 · 5,55 μ
HFK 5	<i>Scop. insectivora</i>	6,45 · 5,15 μ
HFK 6	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	5,92 · 5,54 μ
HFK 7	<i>Scop. brevicaulis</i> var. <i>alba</i>	6,18 · 5,82 μ
HFK 8	<i>Scop. brevicaulis</i> var. <i>alba</i>	5,85 · 5,44 μ
HFK 9	<i>Scop. alboflavescens</i>	6,12 · 5,8 μ
HFK 10	<i>Scop. alboflavescens</i>	5,11 · 4,9 μ
HFK 11	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	5,74 · 5,41 μ
HFK 12	<i>Scop. insectivora</i>	6,32 · 5,22 μ
HFK 13	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	6,16 · 5,5 μ
HFK 14	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	6,09 · 5,73 μ
HFK 15	<i>Scop. brevicaulis</i> var. <i>glabra</i>	5,78 · 5,33 μ
HFK 16	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	6,15 · 5,98 μ
HFK 17	<i>Scop. rufulus</i>	5,62 · 5,04 μ
HFK 18	<i>Scop. koningi</i>	5,72 · 5,29 μ
HFK 19	<i>Scop. koningi</i>	5,98 · 5,38 μ
HFK 20	<i>Scop. brevicaulis</i> var. <i>glabra</i>	5,95 · 5,63 μ
HFK 21	<i>Scop. brevicaulis</i> B.	5,93 · 5,55 μ
HFK 22	<i>Scop. sphaerospora</i>	4,38 · 4,21 μ
HFK 23	<i>Scop. brumptii</i> (?)	4,45 · 4,37 μ

3. Verhalten gegenüber Chitin

Mit einem sehr einfach kombinierten Nährboden, der neben 25 g Chitin nur 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4$, und 0,5 g $NaNO_3$ neben 2% Agar auf 1 l Wasser enthielt, sollte zuerst geprüft werden, ob Chitin als einzige C-Quelle ausreichende Ernährungsbedingungen für die verschiedenen *Scopulariopsis*-Folgestämme bieten könne.

Da nach PRINGSHEIM u. KRÜGER (1932) zwischen tierischem und pflanzlichem Chitin kein Unterschied besteht, wurde für diesen Versuch käufliches Crustaceen-Reinchitin verwendet, das mehrmals gewaschen wurde. Das getrocknete Chitin wurde dann im Mixer noch feiner zerkleinert und mit der genannten Nährlösung vermengt.

Der pH-Wert des Nährbodens lag zwischen 5,5 und 6. Eine Kontrollprobe auf Chitosan mit JKJ und H_2SO_4 verd. verblieb negativ. Nach dem Sterilisieren wurde durch kräftiges Umschütteln dafür gesorgt, daß die Chitinflöckchen nicht sedimentierten, sondern im rasch erstarrenden Agar an der Oberfläche blieben, so daß ein engerer Kontakt mit den Pilzhypen möglich war.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe besagen zusammengefaßt, daß von den 23 von Hausschwammfruchtkörpern isolierten *Scopulariopsis*-Stämmen 6 sich durch ein sehr gutes Wachstum auf Chitin als einziger C-Quelle auszeichnen, und zwar 5 Vertreter von *Scopulariopsis brevicaulis* B., nämlich die Stämme von HFK 1, 3, 11, 14 und 16 und *Scopulariopsis brumptii* von HFK 23.

Bei den übrigen drei *Scopulariopsis brevicaulis*-Stämmen waren die erzielten Mengen an Mycel und Conidien zwar geringer, aber noch so gut und reichlich, wie sie bei einem Hungerwachstum nie auftreten würden. Während also acht Folgestämme von *Scopulariopsis brevicaulis* Chitin mehr oder minder gut angreifen, war einem Vergleichsstamm aus Baarn diese Fähigkeit nicht eigen, wie auch Wiederholungsversuche bestätigten. Die anderen *Scopulariopsis*-Arten der Folgestämme erreichten nur mäßige oder schwache Mycel- und Conidienmengen.

Neben der Bewertung des Wachstums als Maßstab für einen Chitinabbau wurde auch auf die Anwesenheit von Chitosan geprüft. Die Probe verlief fast in allen Fällen positiv.

Zur Kontrolle, ob das Chitosan aus dem Chitin durch die Einwirkung der Pilze und nicht durch irgendwelche Abbaureaktionen nach der mechanischen Zerkleinerung und dem Sterilisieren in der Nährlösung entstanden sei, wurde eine Aufschwemmung von Chitin mit sterilem Wasser (5 g Chitin in größeren Blättchen in 200 cm³ Wasser) hergestellt und größere Stücke von Myceldecken der Stämme *Scop. brevicaulis*, *Scop. insectivora*, *Scop. brumptii*, *Scop. arnoldi* und *Scop. bestae* auf dieses Medium gegeben. Nach 4 Wochen hatten in allen Fällen die Myceldecken beträchtlich an Umfang zugenommen und dabei die Chitinflocken mit den Hyphen umspinnen. Die Probe auf Chitosan fiel nach dem Zerreiben von Mycel mit noch anhaftenden Chitinresten positiv aus, sprach also für die Fähigkeit des Chitinabbaues durch einzelne Stämme. (Kontrollen auf die Anwesenheit etwaiger chitinabbauender Bakterien verliefen alle negativ.)

Die Erwartung, daß Chitin auch zur N-Versorgung dienen könne, wenn keine anderen N-Lieferanten vorhanden waren, fand ebenfalls eine rasche und eindeutige Bestätigung, die sich im guten bis ausgezeichneten Wachstum aller *Scopulariopsis*-Folgestämme äußerte. Die höchsten Erträge lieferten 3 *Scopulariopsis brevicaulis*-Stämme, nämlich von HFK 6, 11, und 16.

Als Nährmedium diente hier eine Czapek-Dox-Lösung, in der an Stelle von 0,2% NaNO₃ zur N-Versorgung 1,25% Chitin geboten wurden. Der pH-Wert lag bei 5,75.

Obwohl man einschränkend berücksichtigen muß, daß Pilze durch „Streckung“ gewisser Körpersubstanzen ein Wachstum vortäuschen können, besagt das Gesamtergebnis dieser Versuchsreihe, daß Chitin sowohl als C- als auch als N-Quelle einen echten Zuwachs ermöglichte.

In den einleitenden Versuchen war gezeigt worden, daß bei alkalischer Autolyse die Zellwandsubstanz des Hausschwamms rasch und weitgehend abgebaut wird. Es war daher von weiterem Interesse, ob die *Scopulariopsis*-Successionsflora auch Chitinbruchstücke verwerten kann, wie sie im Verlaufe der Autolyse vielleicht in Form von Glucosamin oder anderen Aminen anfallen.

4. Verhalten gegenüber Glucosamin

Auf Glucosamin als N-Quelle reagierten von den Hausschwammfolgestämmen mit sehr gutem Wachstum: 2 Stämme von *Scop. brevicaulis*

alba (7 und 8) und der allgemein sehr wüchsige und widerstandsfähige Stamm 6: *Scop. brevicaulis*. Die übrigen 7 *brevicaulis*-Stämme lieferten gute Erträge, ebenso die beiden Vertreter von *Scop. insectivora* (5 und 12), *Scop. rufulus* (17), *Scop. koningi* (18), und *Scop. brumptii* (23). Mehr oder minder mäßig entwickelten sich die Stämme von *Scop. brevicaulis glabra* (2, 4, 15, 20), von *Scop. alboflavescens* (9 und 10), *Scop. sphaerospora* (22), und Stamm 19 (*Scop. koningi?*).

Wurde Glucosamin zur C-Versorgung gereicht, so blieb das Wachstum sämtlicher *Scopulariopsis brevicaulis*-Stämme mäßig, höchstens mäßig gut. Demgegenüber bildeten die weißen Folgestämme *Scop. brevicaulis* var. *glabra* von HFK 2, 4, 15 und 20, und *Scop. alboflavescens* von HFK 9 und 10 rasch und reichlich Conidien aus und zeigten allgemein bessere Erträge, wenn sich auch der Wachstumseffekt von Glucosamin in keiner Weise etwa mit dem von Glucose vergleichen läßt.

Diese auffallende Differenz zwischen dem Verhalten auf Chitin- und auf Glucosaminnährböden legt den Gedanken nahe, daß möglicherweise bei der Successionsbesiedelung in der Natur die einzelnen *Scopulariopsis*-Arten zeitlich nacheinander auftreten. Dabei dürften beim ersten Angriff auf Chitin die schwarzen und dunkelbraunen *Scopulariopsis*-Arten sicher eine maßgebende Rolle spielen, z.B. *Scop. brumptii*, *Scop. sphaerospora* und *Scop. arnoldi*. Hellere *Scopulariopsis*-Arten, wie sie von den Hausschwammfruchtkörpern isoliert wurden, überwuchern diese dunklen Arten später. Daher konnten nur in zwei Fällen an Hausschwammfruchtkörpern schwarze Arten gefunden werden, die jedoch schon in der Rohkultur von *Scopulariopsis brevicaulis* var. *glabra* verdrängt wurden.

5. Verhalten gegenüber Methylamin und Dimethylamin

Zur Klärung des Fragenkomplexes über die Verwertung bzw. Auslesewirkung von Autolyseprodukten sollte in einer weiteren Versuchsreihe das Verhalten von *Scopulariopsis*-Arten gegenüber diesen beiden, bei fortschreitender Autolyse nachgewiesenen Aminen geprüft werden. Die Wachstumsversuche (durchgeführt auf Czapek-Dox-Lösung mit jeweils 0,001 mol Amin als einziger N-Quelle) erbrachten zusammengefaßt folgendes Bild:

Methylamin wird von *Scopulariopsis*-Arten nicht wesentlich besser aufgenommen als von gewöhnlichen Schimmelpilzen. Nur 4 der 23 Folgestämme reagierten mit wirklich gutem Wachstum, nämlich ein Stamm *Scop. insectivora* (von HFK 5), ein Stamm *Scop. brevicaulis* B., (von HFK 13), Stamm von HFK 19, (? *Scop. koningi*), und *Scop. brumptii* (von HFK 23).

Dimethylamin wurde von *Scop. insectivora* (Stamm von HFK 5), von *Scop. koningi* (? Stamm von HFK 19), von *Scop. sphaerospora* (Stamm von HFK 22) und von *Scop. brumptii* (Stamm von HFK 23)

gut verwertet, also von Stämmen, die auch schon auf Methylamin größere Erträge erzielt hatten. Zwölf weitere Stämme lieferten mehr oder minder mäßige Mycel- und Conidienmengen; bei den restlichen war das Wachstum schwach. Trotzdem legt das gute Gedeihen der vier erstgenannten Folgestämme den Schluß nahe, daß das Auftreten von Aminen bei der Autolyse das Wachstum gewöhnlicher Schimmelpilze aus der *Penicillium*-Verwandschaft u.ä. zugunsten einzelner *Scopulariopsis*-Arten unterdrückt.

6. Verhalten gegenüber Aminosäuren

Mit dem Nachweis, daß manche *Scopulariopsis*-Arten fähig sind, Chitin anzugreifen, sodaß ihnen ein Zutritt zum Zellinhalt des besiedelten Hausschwammes möglich ist, war als weitere Frage aufgetaucht, unter welchen Bedingungen die im Hausschwammprotein vorliegenden Aminosäuren, besonders die schwefelhaltigen, von ihnen abgebaut würden.

Da mit Sicherheit angenommen werden konnte, daß *Scopulariopsis*-Arten kaum Ansprüche in Form eines komplizierten Stickstoff-Bedarfes stellen würden, wurde in der betreffenden Versuchsreihe jeweils eine der 15 nachgewiesenen Aminosäuren (siehe S. 4) in einer Konzentration von 0,001 mol in der Nährlösung verabreicht. Die Versuche umfaßten nur eine Auswahl der Folgestämme, nämlich diejenigen 4 Stämme von *Scop. brevicaulis* B. (1, 3, 11 und 16), deren Angriffsvermögen auf Chitin besonders stark war; ferner 3 Stämme von *Scop. brevicaulis* var. *glabra* (2, 4 und 20), *Scop. alboflavescens* (10), *Scop. brumptii* (Stamm 23) und *Scop. sphaerospora* (Stamm 22). Ein Überblick über die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ergibt folgendes Bild:

Bei allen Folgestämmen, mit Ausnahme von *Scop. brumptii*, rief Glutaminsäure, die als einzige Aminosäure im Hausschwammprotein in größerer Menge, nämlich mit etwa 5%, vorkommt (auch als sog. freie Aminosäure), sehr gutes bis ausgezeichnetes Wachstum hervor. Das reiche Vorkommen dieses Eiweißbausteines und sein optimaler Wachstumseffekt gestalten somit bei geeignetem pH-Wert die Bedingungen für die nachfolgenden *Scopulariopsis*-Arten besonders günstig.

Bei allen fünf Arten zeigte sich weiterhin ein sehr gutes Wachstum auf Prolin, das im Hausschwammfruchtkörper in noch größerer Menge vorhanden ist als im Mycel. Im Gegensatz zu andern Pilzen (vgl. ROBBINS u. Mc VEIGH 1946), reagiert die Gattung *Scopulariopsis* also nicht mit Hemmungserscheinungen auf Prolin.

Charakteristisch für die vier Stämme von *Scop. brevicaulis* B. und die beiden schwarzen Arten *Scop. brumptii* und *Scop. sphaerospora* war die ausgezeichnete Entwicklung auf Phenylalanin, während die übrigen beiden Arten diese Aminosäure nur mit geringem Ertrag verwerten konnten.

Auch mit Threonin wurden allgemein sehr gute Erträge erzielt. Besonders auffallend war das Verhalten von Methionin, da es unter der unangenehmen Geruchsentwicklung nach Methylmercaptan verlief.

Der Nachweis von CH_3SH erfolgte außer der Geruchsprobe durch die Reaktion nach Denigès, wobei ein Tropfen einer 1%igen Lösung von Isatin in konz. H_2SO_4 an einem ausgezogenen Glasröhrchen hing, das im Stopfen des Kultur-Kolbens befestigt war. Nach einiger Zeit trat Grünfärbung ein.

Der chemische Verlauf dieser Reaktion war bereits Gegenstand umfassender Untersuchungen über die biologische Methylierung durch CHALLENGER u. Mitarb. (1947). Sie berichteten über die Spaltung von Mono- und Disulfidbindungen durch Pilze, nachdem *Scop. brevicaulis* aus Brotkulturen, denen Methionin zugesetzt war, „Methylthiol“ entwickelt hatte. Der Abbau soll dabei über eine Zwischenstufe, nämlich die entsprechende Ketosäure $\text{CH}_3 \cdot \text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$ verlaufen.

Während mit einer intensiven $\text{CH}_3\text{-SH}$ -Entwicklung für die Arten *Scop. brevicaulis*, *Scop. brumptii* und *Scop. sphaerospora* ein sehr gutes Wachstum verbunden war, war letzteres bei den beiden anderen Arten geringer. Eine Hemmung jedoch, wie sie z.B. mit S-haltigen Aminosäuren speziell bei dermatophytischen Pilzen schon beschrieben worden war (KÖNIGSBAUER 1951), zu denen ja auch zahlreiche *Scop.*-Arten zählen, trat nirgends auf. Hier sei besonders darauf hingewiesen, daß sich *Scop. brumptii* auch auf Cystein glänzend entwickelte.

Diese Resistenz mancher *Scopulariopsis*-Arten gegenüber Substanzen, die für andere Pilze bereits giftig wirken, ist mit einer der Gründe, warum ihre weitverbreiteten Sporen bei der Besiedelung zahlreicher Standorte Fuß fassen können.

In diesem Zusammenhang sei auch auf Beobachtungen von ZOBL (1943) verwiesen, nach denen *Scopulariopsis*-Conidien 29—35 Monate ihre volle Keimfähigkeit behielten, also auch hier andere Pilze übertrafen. Diese Eigenschaften können als weitere Ursachen für das Auftreten speziell der Gattung *Scopulariopsis* als Successionspilz angesehen werden.

Ordnet man die geprüften Aminosäuren nach ihrer Eignung, so lassen sich folgende Reihen aufstellen:

Für *Scop. brevicaulis* B.: Glutaminsäure, Prolin, Phenylalanin, Threonin, Valin, Methionin, Alanin, Glycin, Leucin, Serin, Cystin, Cystein, Lysin.

Für *Scop. brevicaulis* var. *glabra*: Alanin, Prolin, Valin, Threonin, Serin, Glycin, Phenylalanin, Leucin, Glutaminsäure, Cystin, Cystein, Methionin, Lysin.

Für *Scop. alboflavescens*: Valin, Prolin, Serin, Threonin, Alanin, Glycin, Leucin, Glutaminsäure, Methionin, Cystein, Phenylalanin, Cystin, Lysin.

Für *Scop. brumptii*: Phenylalanin, Valin, Alanin, Methionin, Cystein, Prolin, Threonin, Glycin, Serin, Cystin, Leucin, Glutaminsäure, Lysin.

Für *Scop. sphaerospora*: Phenylalanin, Valin, Alanin, Methionin, Prolin, Threonin, Glutaminsäure, Glycin, Serin, Cystin, Leucin, Cystein, Lysin.

Da sich in der Versuchsreihe über den Abbau von Aminosäuren die eingangs geäußerte Vermutung bestätigt hatte, daß der üble Geruch alter Hausschwammfruchtkörper auf die Tätigkeit ihrer Folgebesiedler zurückzuführen ist, lag es nahe, unter diesem Gesichtspunkt auch eine der

bemerkenswertesten physiologischen Eigenschaften der Gattung *Scopulariopsis* zu untersuchen, nämlich ihre Fähigkeit, aus Arsen-haltigen Bestandteilen flüchtige Arsenverbindungen mit charakteristischem Geruch freizumachen.

7. Verhalten gegenüber Arsenverbindungen

Schon früh interessierte man sich für die Natur des beim Abbau von Arsenverbindungen entstehenden Gases. 1893 bezeichnete GOSIO es als Alkylarsin, später hielt BIGINELLI (1901) es für Diäthylarsin, KLASON (1914) für Äthylkakodyloxyd und wieder andere vermuteten Äthylarsin. 1933 bewiesen CHALLENGER u. Mitarb., daß das gebildete Gas Trimethylarsin sei. Trotzdem hielt sich in zahlreichen Beschreibungen bis in die jüngste Zeit hartnäckig die Behauptung, daß es sich bei dem knoblauchartig riechenden Gas, das *Scopulariopsis*-Arten bilden, um Diäthylarsin handle.

Unter den Arbeiten, welche diese typische Fähigkeit der Arsenfreimachung unter verschiedensten, meist chemischen Gesichtspunkten behandelten, sei die von BREITER (1936) besonders erwähnt, da sie einige Ergebnisse enthält, die auch für die Frage nach der Successionsbesiedelung von Bedeutung sein dürften. So können hiernach durch *Scopulariopsis*-Arten minimalste Mengen Arsen (wie sie z. B. im menschlichen Blut normalerweise vorhanden sind), in flüchtige Verbindungen überführt und durch den Geruch eindeutig nachgewiesen werden. Andererseits sollen aber schon sehr geringe Mengen von Arsen (etwa 10 γ) auf die biologische Tätigkeit des Pilzes hemmend wirken.

Da bis heute noch kein Nachweis darüber erbracht ist, ob in Hausschwammycel oder -fruchtkörpern solche Spuren an Arsen vorhanden sind, die dann bei deren Besiedelung durch *Scopulariopsis*-Arten freigemacht werden könnten, wurde bei orientierenden Versuchen sterilisiertes, zerriebenes Hausschwammycel bzw. zerriebenes Fruchtkörpergewebe als Nährboden für *Scopulariopsis*-Folgestämme verwendet. Im letzteren Falle ließ sich neben dem typischen Pilzgeruch eine Komponente feststellen, die stark und deutlich an Arsine erinnerte.

Die oben erwähnte Hemmwirkung von Arsen soll sich nach BREITER (1935/36) bei Gaben von 0,1 mg an bereits mit bloßem Auge feststellen lassen und ihren hauptsächlichen Ausdruck in einer verminderten Atemtätigkeit finden. In einer Versuchsreihe sollten daher Wachstums- bzw. Hemmwirkung verschiedener Arsenverbindungen auf sämtliche *Scopulariopsis*-Arten der Folgegesellschaft beschrieben werden.

Als Nährboden diente ein Brot-Kartoffel-Reis-Brei (500 g Schwarzbrot, 500 g Kartoffel, 125 g Reis auf 1 l Wasser) von dem je 20 cm³ in Erlenmeyerkolben gegeben wurden. Dazu kam je 1 mg Na-arsenat, K-arsenat, Na-arsenit oder Arsentrioxyd, also eine Arsenmenge, die 50 mal höher bemessen war als z. B. die von ZACH (1934) verwendete. Die Prüfung auf entstandene Arsine erfolgte im Abstand von jeweils 3 Tagen.

Die verblüffendste Feststellung dieser Untersuchungsreihe war, daß sich hier, wo ein unmittelbarer Vergleich möglich war, deutliche Unterschiede in der Geruchsart (!) der einzelnen *Scopulariopsis*-Arten feststellen ließen. Durch Geruchsvergleich mit der Originalsubstanz konnte der Geruch sämtlicher brauner Stämme der Art. *Scop. brevicaulis* und der der beiden schwarzen Arten *Scop. sphaerospora* und *Scop. brumptii* eindeutig als der von Trimethylarsin erkannt werden.

Neben dieser Geruchsart zeichneten sich die Stämme *Scop. brevicaulis* var. *glabra* und *Scop. alboflavescens* nicht nur durch einen „sehr kräftigen“ Arsengeruch (wie ZACH 1934 berichtete) aus, sondern durch eine mehr Meerrettich-artige, stechend scharfe Geruchskomponente. Auf Grund dieses unterschiedlichen Geruchscharakters lassen sich diese untereinander näher verwandten Arten von der vorhergehenden, weiter verwandten Gruppe eindeutig unterscheiden.

Bei der Zusammenstellung von Kulturen mit gleichem Geruch ergaben sich noch zwei kleinere, nur schwächer abweichende Gruppen (ebenfalls wieder mit der systematischen Zugehörigkeit übereinstimmend): 1. bei den zwei Stämmen HFK 5 und 12 von *Scop. insectivora* wurde eine rübenartige Komponente neben dem Arsengeruch der *Brevicaulis*-Gruppe verzeichnet. Von WEIGMANN u. WOLFF wurde bereits 1909 über Vertreter der Gattung *Scopulariopsis* unter solchen Mycelpilzen berichtet, die einen „Steckrübengeschmack der Butter“ verursachen. Auf Grund ihrer Zeichnung dürfte es sich bei dem damals nicht bestimmbar Pilz um *Scop. brevicaulis* var. *alba* gehandelt haben, der mit *Scop. insectivora* nahe verwandt ist. — 2. Bei den Stämmen von HFK 17 (*Scop. rufulus*), 18 und 19 (*Scop. koningi*) war neben dem Geruch nach $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ eine „mehr senföartige“ Beimischung zu verzeichnen.

Unter den Mitteilungen über die Produktion unangenehm riechender Substanzen durch die Gattung *Scopulariopsis* liegt auch eine von BLINC (1940) vor. Sie berichtet dabei über einen Pilz, der von überreifem Camembert isoliert wurde und an dem sie bei sehr alten Kulturen „den bekannten, intensiven Geruch nach Carbylamin“ beobachtete. Es ist dies die einzige Literaturangabe, nach der von *Scopulariopsis*-Arten auch Isonitrile gebildet werden sollen. Bei sämtlichen eigenen, schon 8 Monate alten Kulturen ließ sich diese Beobachtung nirgends wiederholen. Dies ist insofern leicht erklärlich, als der von BLINC als „*Scopulariopsis*“ angesprochene Pilz nicht zu dieser Gattung gehört. Sowohl auf Grund der beigegebenen Zeichnung als auch der Beschreibung, nach der es sich um einen „blattgrünen bis spinatgrünen Conidienrasen“ des Pilzes handelt, müßte er in die Verwandtschaft *Verticillium-Trichoderma* eingeordnet werden. (Als bisher ohne Ausnahme bestehendes Gattungscharakteristikum wurde nämlich schon von THOM (1930) angeführt, daß *Scopulariopsis*-Arten niemals grün sind.)

Die Wachstumsverhältnisse sämtlicher Folgestämme auf Na- und K-arsenat und Arsentrioxyd waren durchgehend sehr gut; Hemmungserscheinungen irgendwelcher Art waren trotz der hohen Arsenkonzentration nicht sichtbar.

Die Stämme *Scop. brevicaulis* B. (1, 3, 6, 11, 13, 14, 16 und 21) bildeten reichlich Mycel, das in manchen Kulturen zur Coremienbildung neigte. Unter kräftiger Conidienausbildung war nach spätestens einer Woche die Myceloberfläche mit braunen Conidien übersät. Nach einigen Wochen entstanden in mehreren Kulturen sklerotienartige Knoten.

Die vier Stämme *Scop. brevicaulis* var. *glabra* (2, 4, 15 und 20) gediehen ausgezeichnet, bei 4 und 15 traten nach etwa 6 Tagen Exsudattröpfchen auf, Stamm 20 bildete zahlreiche weiße Sklerotien. Die Conidienproduktion setzte bei allen Stämmen rasch und kräftig ein. Stamm 15 übertraf die übrigen in der Intensität der Geruchsbildung.

Bei den Stämmen *Scop. alboflavescens* (9 und 10) wurden vereinzelt schwarze, kleine Pünktchen, die rudimentären Peritheccien entsprechen, an den Rändern der Breinährböden angetroffen. Ihr Wachstum, ihre Conidienbildung und Geruchsproduktion waren analog den *Scop. brevicaulis* var. *glabra*-Stämmen.

Die Stämme *Scop. rufulus* (17) und *Scop. koningi* (18 und 19?) zeigten sehr gute Mycel- und Conidienmengen.

Die Stämme *Scop. insectivora* (5 und 12) wiesen ebenfalls umfangreiche Mycelmengen auf, die samtartig von Conidien überzogen waren.

Die Stämme *Scop. brevicaulis* var. *alba* (7 und 8) waren trotz reichlicher Conidienmenge weniger wüchsig, ihr Mycel neigte stark zur Coremienbildung. Auf K-arsenat trat bei Stamm 7 ein deutlicher dumpfer Pilzgeruch auf.

Scop. sphaerospora von HFK 22 und *Scop. brumptii* von HFK 23 bevorzugten beide K-arsenat, wo die größten Mycel- und Conidienmengen auftraten. Die Arsinentbindung war auf allen drei Verbindungen gleich gut.

Auf Na-arsenit war bei sämtlichen *Scopulariopsis*-Gruppen das Anfangswachstum sehr langsam, so daß auch die Bildung der flüchtigen Arsenverbindungen später einsetzte als auf den übrigen Substanzen. Nach etwa 1 Woche aber holten die meisten Kulturen auf und zeigten dann ein ausgezeichnetes, gleichmäßiges Wachstum. Unter den schwach gehemmten Kulturen waren die Stämme 5, 7 und 8, die zwar gleich gute Mycel- und Conidienmengen bildeten, aber einen mehr oder minder starken dumpfen Pilzgeruch aufwiesen, wie er von BREITER (1936) bei seinen gehemmten Kulturen gefunden worden war. Deutlich reduziert waren sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch die Wachstumsintensität bei den Stämmen *Scop. rufulus* (17) und *Scop. koningi* (18) und etwas auch bei Stamm 19. Trotzdem waren auch hier die Myceldecken am Ende der vierwöchigen Kulturperiode mit hellen Conidien bedeckt.

Zur Ermittlung eines etwaigen, reduzierenden Einflusses auf das Conidienmaß wurden bei der Reihe mit Na-arsenit die Conidien sämtlicher Folgestämme vermessen und in Tab. 6 zusammengestellt.

Tabelle 6. *Conidienmaße in Kulturen mit Na-Arsenit*

Stamm	Conidienform	Conidienmaße auf Natrium-Arsenit
HFK 1	stark warzig, rund bis citronenförmig	Längenmittel: 6,39 μ , Breitenmittel 5,51 μ (kleiner als Querschnitt)
HFK 2	glatt, fast rund	Längenmittel: 5,97 μ , Breitenmittel 5,72 μ (Länge geringer, Breite größer als Querschnitt)
HFK 3	grob warzig	Längenmittel: 6,4 μ , Breitenmittel 5,7 μ (etwas kleiner als Querschnitt)
HFK 4	glatt, Großteil rundlich	Längenmittel: 5,97 μ , Breitenmittel 5,68 μ (etwas kleiner als Querschnitt)
HFK 5	warzig, dazwischen viele glatte, längliche Formen	Längenmittel: 6,2 μ , Breitenmittel 5,62 μ (etwas größer als Querschnitt)
HFK 6	stark warzig, rundlich	Längenmittel: 6,15 μ , Breitenmittel 5,93 μ (etwas größer als Querschnitt)
HFK 7	glatt und warzig ge- mischt, länglich	Längenmittel: 6,32 μ , Breitenmittel 5,45 μ (Länge etwas größer, Breite geringer als Quer- schnitt)
HFK 8	glatt und warzig ge- mischt, länglich	Längenmittel: 6,53 μ , Breitenmittel 5,56 μ (etwas größer als Querschnitt)
HFK 9	glatt, rundlich, ein- zelne länglich	Längenmittel: 6,52 μ , Breitenmittel 6,09 μ (größer als Querschnitt)
HFK 10	glatt, länglich-rund	Längenmittel: 6,35 μ , Breitenmittel 6,07 μ (viel größer als Querschnitt)
HFK 11	stark warzig, länglich und rund	Längenmittel: 6,11 μ , Breitenmittel 5,93 μ (größer als Querschnitt)
HFK 12	warzig-rund, länglich- glatt	Längenmittel: 6,61 μ , Breitenmittel 5,65 μ (größer als Querschnitt)
HFK 13	stark warzig, (einzelne sehr klein)	Längenmittel: 6,51 μ , Breitenmittel 5,64 μ (größer als Querschnitt)
HFK 14	stark warzig, meist rund	Längenmittel: 6,59 μ , Breitenmittel 6,42 μ (größer als Querschnitt)
HFK 15	glatt, rundlich	Längenmittel: 6,04 μ , Breitenmittel 5,67 μ (größer als Querschnitt)
HFK 16	stark warzig, rund und länglich	Längenmittel: 6,6 μ , Breitenmittel 6,02 μ (größer als Querschnitt)
HFK 17	glatt, sehr große u. sehr kleine Formen, rund bis citronenförmig	Längenmittel: 6,31 μ , Breitenmittel 5,21 μ (größer als Querschnitt)
HFK 18	glatt, länglich und rund	Längenmittel: 6,08 μ , Breitenmittel 5,72 μ (größer als Querschnitt)
HFK 19	glatt, länglich	Längenmittel: 6,58 μ , Breitenmittel 5,67 μ (größer als Querschnitt)
HFK 20	glatt, rundlich	Längenmittel: 6,65 μ , Breitenmittel 6,07 μ (größer als Querschnitt)
HFK 21	warzig, gemischt rund und länglich	Längenmittel: 6,28 μ , Breitenmittel 5,46 μ (Länge größer, Breite geringer als Querschnitts- wert)
HFK 22	glatt, klein, rund	Längenmittel: 4,08 μ , Breitenmittel 4,09 μ (kleiner als Querschnitt)
HFK 23	glatt und schwach rauh, klein, rund	Längenmittel: 4,41 μ , Breitenmittel 4,21 μ (kleiner als Querschnitt)

Conidienmaße auf Brot-Kartoffel-Reis-Brei ohne As-Salze (Blindwerte)

Stamm		Stamm	
HFK 1	6,6 × 6,53 μ größer als mit As	HFK 2	6,92 × 6,18 μ viel größer als mit As
HFK 3	6,46 × 5,81 μ größer als mit As	HFK 4	6,67 × 5,86 μ größer als mit As
HFK 11	6,5 × 5,84 μ Länge größer, Breite kleiner als mit As	HFK 10	6,24 × 5,76 μ kleiner als mit As
HFK 16	6,57 \varnothing rund (weil hier rund) größer	HFK 20	6,51 × 6,12 μ Länge kleiner, Breite größer als mit As

Ein Vergleich zwischen den Blindwertmessungen und den Conidienmaßen auf Na-arsenit zeigte also, daß die Vergrößerung gegenüber einem errechneten Querschnittwert (= Mittel aus den Werten der Kulturen auf Czapek-Dox-Lösung, auf Schimmelpilzlösung, auf Würze- und Haferflockenagar) vielmehr auf die optimale Nährbodenwirkung, als etwa auf einen stimulierenden Einfluß des As zurückzuführen ist.

Eine Hemmung des Pilzwachstums durch As war in keinem Fall nachweisbar.

Zusammenfassung

Der biologische Ablauf der Autolyse von Mycel und Fruchtkörper des Echten Hausschwammes wurde durch Chitinbestimmungen erfaßt. Dabei lassen sich (entsprechend der Benennung nach BEHR) zwei Typen feststellen: eine saure Autolyse, wie sie besonders bei künstlicher Kultivierung auftritt, und eine alkalische Autolyse, die hauptsächlich die Fruchtkörper am natürlichen Standort erfaßt. Während die saure Autolyse in ihrer Abbautendenz schwächer ist — es werden Aminosäuren in die Nährlösung abgegeben — wird bei alkalischer Autolyse die gesamte Pilzsubstanz tiefgreifend abgebaut. Die Hauptmenge des vorhandenen Stickstoffes wird in Form von NH_3 , von Methyamin und Dimethylamin freigemacht.

Entsprechend diesen beiden Autolysetypen treten auf Grund der dabei entstehenden Selektion zwei verschiedene Pilzsuccessionsgesellschaften auf. Die Arten beider Gesellschaften wurden über mehrere Jahre hin registriert. Die am häufigsten und mit den meisten Arten vertretene Pilzgattung der Gruppe B (= nach alkalischer Autolyse) ist die Gattung *Scopulariopsis*. Unter 23 von Hausschwammfruchtkörpern isolierten Stämmen wurden 9 verschiedene Arten bestimmt.

Die Ursachen für das bevorzugte Gedeihen dieser Gattung sind in mehreren physiologischen Faktoren zu suchen.

1. Die Gattung *Scopulariopsis* verträgt pH-Werte bis 9.
2. Mehrere der isolierten Folgestämme waren in der Lage, Chitin, die Zellwandsubstanz des Hausschwammes, anzugreifen.
3. Da auch Glucosamin und die beiden nachgewiesenen Amine zur Stickstoff-Versorgung ausreichen, könnte an einen Abbau der Zellwand in dieser Reihenfolge gedacht werden.
4. Die Angriffsfähigkeit auf Chitin schließt gleichzeitig die Möglichkeit eines Zugangs zum noch nicht autolysierten Zellinhalt in sich, etwa zu den im Hausschwammprotein nachgewiesenen 15 Aminosäuren.
5. Eine auffallende Parallelität zwischen den im Hausschwamm vorkommenden Aminosäuremengen und ihrem Wachstumseffekt bei *Scopulariopsis*-Arten erklärt ebenfalls deren bevorzugte Eignung als Sekundärbesiedler auf Hausschwamm.
6. Unter den schwefelhaltigen Aminosäuren wurde Methionin unter Entwicklung von Methylmercaptan von mehreren Arten abgebaut. Dies zeigt, daß der üble Geruch alter Fruchtkörper durch die Tätigkeit der Successionsbesiedler mitbedingt wird.
7. Auch das Verhalten der Gattung *Scopulariopsis* auf verschiedenen Arsenverbindungen wurde geprüft. Außer dem bei der *Brevicaulis*-Gruppe ohne Beimischung entstehenden Trimethylarsin zeichneten sich die anderen, untereinander näher verwandten Gruppen dieser Gattung durch eigene, charakteristische Geruchsbeimengungen aus.

Eine Abgrenzung der einzelnen Arten, auf Grund physiologischer und morphologischer Charakteristika, wird in einer folgenden Abhandlung beschrieben.

Literatur

- ANDRUS, C. F., and L. L. HARTER*: J. Agr. Res. **46**, 1059 (1933).
 BACH, S. J.: Biol. Rev. **20**, 158 (1945).
 BAINIER, G.*: Mycothèque de l'École de Pharmacie. Bull. Soc. mycol. France **23**, 98, 125 (1907).
 BEHE, G.: Arch. Mikrobiol. **1**, 418 (1930).
 BEYMA THOE KINGMA, F. H.*: Zbl. Bakt., II. Abt. **96**, 411 (1937); **99**, 392 (1939).
 BEYMA THOE KINGMA, F. H.*: Antonie v. Leeuwenhoek **10**, 41 (1944).
 BIRKINSHAW, J. H., W. P. K. FINDLAY and R. A. WEBB: Biochem. J. **36**, 526 (1942).
 BLINC, M.: Arch. Mikrobiol. **11**, 391 (1940).
 BREITER, S.: Arch. Hyg. (Berl.) **115**, 291 (1935/36).
 BUCHERER, H.: Zbl. Bakt., II. Abt. **93**, 12 (1935).
 CHALLENGER, F.: Chem. Rev. **36**, 315 (1945) und 219 Literaturangaben.
 CHALLENGER, F., and PH. CHARLTON: J. chem. Soc. Part. I, **84**, 424 (1947).
 CURZI, M.*: Boll. della Staz. di Pat. veget. di Roma **10**, 302 (1930); **11**, 55 (1931).
 DOLD, H., u. H. W. WITZENHAUSEN: Zbl. Bakt., II. Abt. **60**, 217 (1953/54).
 ÉMILE-WEIL, P., et L. GAUDIN*: Arch. Méd. exp. **28**, 458 (1919).
 EMMONS, C. N., and B. O. DODGE*: Mycologia (N. Y.) **23**, 313 (1931).
 GÄUMANN, E.*: Die Pilze. Basel 1949.
 GÄUMANN, E.*: Vergleichende Morphologie d. Pilze. Jena 1926.
 GEHRING, E.: Zbl. Bakt., II. Abt. **108**, 232 (1954/55).

- GISTL, R.: Arch. Mikrobiol. **7**, 177 (1936).
- GÖTTING, G., L. LAMPRECHT u. M. HILDINGER: Arch. Mikrobiol. **30**, 181 (1958).
- HENNEBERG, W., u. H. KNIEFALL*: Milchwirtsch. Forsch. **13**, 520 (1932).
- HOLFTEN, B. v.: Physiol. Plantarum (Copenh.) **9**, 624 (1956).
- JONES, PH. M.*: Mycologia (N. Y.) **28**, 503 (1936).
- LAFAR, FR.*: Handbuch der techn. Mycologie **4**, §48, Jena 1905—1907.
- LAMPRECHT, L.: Arch. Mikrobiol. **30**, 190 (1958).
- LEGER, M., et M. NOGUE: Bull. Soc. Path. exot. **15**, 654 (1922).
- LEMBKE, A., u. H. DELITSCH*: Ergebn. der theoret. und angewandten Mikrobiol. **1** (1943), Systematik der Schimmelpilze.
- LINDAU, G.*: Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, 8. Leipzig 1907.
- LINDAU, G.*: Die mikroskopischen Pilze. Berlin 1922.
- LINDNER, P.*: Atlas der mikroskop. Grundlagen der Gärungskunde, 1, Tafel 57, Berlin 1927.
- LOUBIÈRE, A.*: Fac. d. Sci. de Paris, Ser. A, No. **892**, 1 (1924).
- MANGENOT, FR.*: Recherches méthodiques sur les champignons de certains bois en décomposition (1952).
- MÖLLER, A., u. R. FALCK: Hausschwammforschungen. Heft 6. Jena 1912.
- MÖLLER, E. F.: Fortschr. chem. Forsch. **2**, 146 (1951).
- OPPERMANN, A.: Arch. Mikrobiol. **16**, 364 (1951).
- PAECH, K., u. M. v. TRACEY: Methoden d. mod. Pflanzenanalyse III, 1067 (1955).
- PRINGSHEIM, H., u. D. KRÜGER: In: Handbuch der Pflanzenanalyse von G. Klein. Wien 1932, 3, spezielle Analyse II, S. 69.
- RAPER, K. B., and CH. THOM*: The Penicillia. Baltimore 1949.
- RIPPEL, A., u. G. BEHR: Arch. Mikrobiol. **6**, 359 (1935).
- RITTER, R.: Arch. Mikrobiol. **22**, 248 (1955).
- SALVANET-DUVAL, G.*: Dissertation. Paris 1935.
- SARTORY, A.*: Progr. méd. (Paris) **31**, 107 (1916).
- SCHMALFUSS, R., u. K. MOTHES: Biochem. Z. **221**, 134 (1930).
- SCHOBER, R.: Jb. wiss. Bot. **72**, 1 (1930).
- SCHWARTZ, W., u. G. KAESS: Arch. Mikrobiol. **5**, 157 (1934).
- SOPP, O.*: Monographie d. Pilzgr. Penicillium. Kristiania 1912.
- THOM, CH.*: The Penicillia (1930).
- THOM, CH., and K. B. RAPER*: Science **76**, 548 (1932).
- VUILLEMIN, P.*: Encyclopédie mycologique 2, Paris 1931.
- WEIGMANN, H., u. A. WOLF: Zbl. Bakt., II. Abt. **22**, 657 (1909).
- ZACH, F.*: Öst. bot. Z. **82**, 173 (1934).
- ZOBL, K. H.: Arch. Mikrobiol. **13**, 191 (1943).
- ZUKAL, H.*: Ber. dtsch. bot. Ges. **8**, 295 (1890).

* Vgl. Anmerkung S. 395.

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Ein atypischer Stamm von *Pseudomonas iodinum*

Von

KARIN SCHMIDT

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Im Rahmen von Untersuchungen über Bakterien in sauren Heideböden (p_H 5,7) traten auf Agarplatten stark verschleimte, mit weinroten bis violetten Kristallen übersäte Kolonien auf. Dieser Farbstoff erwies sich mit dem durch *Pseudomonas iodinum* gebildeten Iodin (Phenazin-Derivat) identisch. In einigen Eigenschaften verhält sich der neu isolierte Stamm jedoch abweichend.

Die Bodenprobe stammte aus einer stark eisenhaltigen Schicht im Totengrund der Lüneburger Heide. Zur Isolierung wurde das Kochsche Plattengußverfahren angewendet. Die farbstoffbildenden Kolonien fielen zuerst auf den sauren, auf p_H 5,5 eingestellten Bouillon-Platten auf. Von diesen wurden sie auf neutralen Bouillon-Agar übertragen, wonach sie auf dem sauren Nährboden nicht wieder anwuchsen. Später zeigte es sich, daß die Wachstumsbedingungen für den Organismus auf einem Agar mit Glycerin (KLUYVER 1956; HAYNES u. Mitarb. 1956), dem 0,1 % Hefeextrakt (Difco) zugesetzt worden war, am günstigsten waren; auf Bouillon ging die Wachsfreudigkeit im Laufe der Zeit zurück. Auch für die Farbstoffbildung erwies sich der Glycerin-Nährboden als vorteilhaft. Jedoch bildeten die Kolonien unter diesen Bedingungen besonders viel und zähen Schleim.

Bei diesem Stamm handelt es sich um Stäbchen von $1 \cdot 2,5 \mu$ Größe, die einzeln, doppelt oder in jungen Kulturen auch in kurzen Ketten von Doppelstäbchen vorliegen. Die Kettenformen verschwinden aber in älteren Wachstumsstadien. Die Stäbchen sind von einer starken Schleimschicht umgeben. An den ersten drei Bebrütungstagen verbreiten die Kulturen einen unangenehmen Geruch, wie er für einige *Pseudomonaden* typisch ist.

Zur Bestimmung des Organismus wurden die üblichen Testreaktionen durchgeführt. Ein Vergleich mit den Eigenschaften, die in „BERGEY“ (1957) für *Pseudomonas iodinum* angegeben sind, zeigte, daß die beiden Stämme in einigen Punkten voneinander abweichen (Tab. 1).

Zur Frage, unter welchen Bedingungen eine Farbstoffbildung stattfindet, wurden bis jetzt nur wenige Versuche gemacht. Das Glycerin des

oben angegebenen Nährmediums wurde durch zehn verschiedene Kohlenhydrate ersetzt. Auf den meisten dieser Nährböden war sowohl die Schleim- wie auch die Kristallbildung gleich oder ähnlich stark wie auf den Platten mit Glycerin. Sehr häufig ging der Kristallbildung eine leichte Rotfärbung des Agars voraus.

Auf Rhamnose und Sorbose waren Wachstum, Schleimbildung und Farbstoffbildung sehr schlecht. (Hierzu wurden keine Vergleiche mit *Ps. iodinum* angestellt.)

Versuche über den Einfluß von Aminosäuren auf die Farbstoffbildung stellte ich in Schüttelkulturen an. Dabei wurde wieder das ursprüngliche Medium mit Glycerin verwendet; Pepton wurde durch 0,1% der zu prüfenden Aminosäure ersetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit denen von DAVIS (1939) verglichen. Auch hier zeigten sich einige Unterschiede in der Reaktionsweise:

Tabelle 1. Vergleich stoffwechselphysiologischer Merkmale von *Pseudomonas iodinum* (A) und dem neu isolierten Stamm (B)

Reaktion	A	B
Säurebildung auf Glucose	—	+
Indolbildung	—	—
Acetoinbildung	—	—
Nitritbildung	+	—
Gelatineverflüssigung	+	—
H ₂ S-Bildung	—	—
Lackmusmilch	+	+
Caseinabbau	—	—
Katalaseaktivität	+	+

Tabelle 2. Iodininbildung durch *Pseudomonas iodinum* (A) und den neu isolierten Stamm (B) mit verschiedenen Aminosäuren

Aminosäuren	A	B	Aminosäuren	A	B
Pepton	+	+	Histidin	+	+
Alanin	+	—	Glutaminsäure	+	—
Asparagin	+	—	Tryptophan	—	+
Arginin	+	—	Tyrosin	(+)	+

Für die Farbstoffgewinnung erwies sich die Schüttelkultur als die günstigste. Die Ausbeute ließ sich durch gute Durchlüftung und Zugabe von 3–4% Glycerin erhöhen.

1-L-Erlenmeyerkolben wurden mit 100 ml Nährmedium gefüllt und bei 28°C 6–7 Tage geschüttelt. Der Farbstoff setzte sich vorwiegend an der Kolbenwand ab. Die Kulturlösung einschließlich der Zellen konnte verworfen werden, da sie nur wenig und infolge der Schleimbildung schwer extrahierbaren Farbstoff enthielten. Die Kulturgefäße wurden mit Wasser ausgespült und der an der Kolbenwand haftende Farbstoff mit 0,5 n NaOH herausgelöst. Durch Einleiten von CO₂ in die klare Lösung wurde der Farbstoff wieder ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mehrere Male mit Wasser gewaschen und über Nacht bei 50–60°C getrocknet. Er ließ sich wegen seiner geringen Löslichkeit schwer wieder aufnehmen. Am besten gelang dies mit Chloroform, das 1% Eisessig enthielt. Durch Zugabe von 0,5–1 n NaOH wurde der Farbstoff in die alkalische Phase überführt. Die Umkristallisation wurde mehrmals wiederholt, bis die Kristalle rein zu sein schienen.

Dann wurden sie wieder bis zur Sättigung in dem Chloroform-Eisessiggemisch aufgenommen, bei 6°C auskristallisiert und dann über einem Membranfilter abgenutscht. Von diesem ließen sie sich gut abkratzen.

Zur Gewinnung reinen Iodinins aus Schüttelkulturen von *Pseudomonas iodinum* mußte anders vorgegangen werden; dieses setzte sich nicht an der Kolbenwand ab, sondern blieb in der Lösung suspendiert. Es ließ sich aber leicht direkt aus der Kulturlösung mit dem essigsäuren Chloroform ausschütteln. Die Reinigung erfolgte dann nach der oben beschriebenen Weise.

Zur Identifizierung des vom Heidestamm gebildeten Farbstoffes wurden die spektralen Absorptionskurven der Farbstoffe beider Stämme am Beckmann-Spektralphotometer Modell DU zwischen 370 und 600 m μ aufgenommen (gesättigte Lösung in essigsäurem Chloroform). Die Kurven zeigten gleiche Maxima. Auch die IR-Spektren zeigten die Identität der beiden Farbstoffe.

Aus den beschriebenen Untersuchungen geht hervor, daß es sich bei dem neu isolierten Stamm um eine atypische Form von *Pseudomonas iodinum* handelt. Die Abweichungen im physiologischen Verhalten lassen sich auf den extremen Standort im sauren nährstoffarmen Heideboden zurückführen.

Für die Überlassung des Stammes von *Pseudomonas iodinum* danke ich Herrn Prof. Dr. TH. WIKÉN. Für die Aufnahme und Auswertung der IR-Spektren bin ich Herrn Dr. MUSSO zu Dank verpflichtet.

Literatur

- BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins Comp. 1957.
- DAVIS, J. G.: *Chromobacterium iodinum* (n. sp.). Zbl. Bakt., II. Abt. **100**, 273—276 (1939).
- HAYNES, W. C., F. H. STODOLA, J. M. LOCKE, T. G. PRIDHAM, H. F. CONWAY, V. E. SOHNS and R. W. JACKSON: *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and Phenazine α -carboxylic acid, its characteristic pigment. J. Bact. **72**, 412—417 (1956).
- KLUYVER, A. J.: *Pseudomonas aureofaciens* nov. spec. and its pigment. J. Bact. **72**, 406—411 (1956).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

Zum Mechanismus des enzymatischen Celluloseabbaus durch *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr.*

Von

JOSEF WEIGL

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. November 1960)

Die älteren Arbeiten über den Mechanismus des Celluloseabbaus befassen sich hauptsächlich mit summarischen Bestimmungen der Cellulaseaktivität, indem sie die Stärke der auftretenden Reduktionswirkung oder etwa die Abnahme der Viskosität während der Tätigkeit des Enzyms verfolgen. Diese Untersuchungen wurden in vergleichender Weise an einer ansehnlichen Zahl von Mikroorganismen ausgeführt. Es sei auf die folgenden zusammenfassenden Darstellungen verwiesen: NORD u. VITUCCI (1948); REESE u. LEVINSON (1952); SIU u. REESE (1952); SCHÄFER (1957); IMSCHENEZKI (1958).

Detaillierte Kenntnis vom Mechanismus des Celluloseabbaus ist indes nur zu erhalten, wenn man den Abbau derart verfolgt, daß man die in zeitlich aufeinanderfolgenden Phasen im Reaktionsgemisch vorliegenden Intermediärprodukte kennenlernt. Während die bei der Spaltung der Cellulose primär auftretenden hochpolymeren, cellodextrinartigen Produkte auf Grund ihres Polymerisationsgrades sowie durch elektronenmikroskopische Beobachtungen (NORKRANS u. RANBY 1956) oder auch durch osmometrische Bestimmungen des Molekulargewichts (SCHÄFER 1957) charakterisiert werden können, müßte es möglich sein, den Mechanismus des Cellodextrin- und Oligosaccharidabbaus durch papierchromatographische Analyse der auftretenden Zwischen- und Endprodukte zu erschließen.

Nachstehend wird über einige Beiträge zur Kenntnis der Verhältnisse bei *Merulius lacrymans* berichtet.

Material und Methoden

I. *Kultur des Pilzes*. Als Untersuchungsobjekt wurde *Merulius lacrymans*, der echte Hausschwamm, gewählt, bei dem man mit Recht hohe cellulolytische Aktivität voraussetzen darf. Der Pilz wurde meistens auf reinstem Cellulosepulver

* Teil 2 einer Dissertation der Fakultät für Chemie, Biologie, Geologie und Mineralogie der Technischen Hochschule Darmstadt. Teil 1 (WEIGL 1961).

(Schl. & Sch.) kultiviert, das mit folgender Salzlösung getränkt war: H_2O 1000 ml; KH_2PO_4 0,7 g; Na_2HPO_4 0,3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; CaCl_2 sicc. 0,1 g; NH_4NO_3 0,5 g; FeCl_3 10%ige Lsg. 1 Tropfen; Hoaglands A—Z Lsg. 0,5 ml; Aneurinhydrochlorid 100 γ . In manchen Fällen wurde die Kultur auf flüssigen Medien vorgenommen; hierbei wurde der Salzlösung ein Kohlenhydratgehalt bis zu 4% zugesetzt. Durch entsprechend geringe Beschickung der Kulturgefäße mit der Nährlösung wurde dem Pilz ungehemmtes Wachstum auf der Oberfläche ermöglicht.

II. Präparation eines zellfreien Enzymsystems. Die auf Cellulose herangewachsenen Mycelien wurden zusammen mit der unverbrauchten Cellulose in 5 Volumteilen eiskaltem n/10 Acetatpuffer (pH 5) aufgeschwemmt und 30 sec in einem Star-mix gerührt. Anschließend wurde 20 min bei Zimmertemperatur mäßig geschüttelt, um ausgiebige Lösung des Proteinmaterials zu erreichen. Die Suspension wurde unter Nachwaschen filtriert und das leicht gelbliche Filtrat nach Einengen auf ein Drittel des ursprünglichen Volumens (Vacuum, 30°C) einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Die bei 30% Sättigung ausfallende Proteinfraktion zeigte geringe Cellobiose- und Cellodextrin-spaltende Fähigkeit. Den Hauptanteil an Aktivität enthielt die folgende, bei 70% Ammonsulfatsättigung fallende Fraktion, während durch Erhöhung der Ammonsulfatkonzentration auf 100% wiederum nur geringe Aktivität zu erhalten war. Die aktivste Fraktion wurde in 30 ml Acetatpuffer (pH 5) aufgelöst und abermals gefällt. Diese Fällung wurde in 10 ml Acetatpuffer (n/20, pH 5) gelöst und in gefrorenem Zustand aufbewahrt. Das lagernde Enzym verlor binnen 40 Tagen etwa 25% seiner Aktivität. Es baute Stärke und Amylodextrine nicht ab.

Es ist nicht gelungen, durch weitere Fällungsprozeduren eine Auftrennung in einen Cellobiase- und Cellulaseanteil zu erreichen. Die bei den Fällungen auftretende beträchtliche Streuung der Aktivität über mehrere Fraktionen legt die Vermutung nahe, daß ein und dasselbe Enzym in verschiedener Bindung vorliegen kann und daher keine einheitlichen physikalischen Eigenschaften zeigt. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß REESE u. GILLIGAN (1953) in *Myrothecium*-Cellulase drei, MILLER u. BLUM (1956) acht, THOMAS u. WHITAKER (1958) sieben aktive Fraktionen gefunden haben. WHITAKER (1953) erhielt mit anderer Methodik jedoch nur eine einheitliche aktive Proteinfraktion.

Bei Kultur des Pilzes auf 1%iger Cellodextrinlösung kann das Mycel durch Filtrieren vollständig abgetrennt werden. Das durch Fällung aus der verbleibenden Kulturflüssigkeit erhaltene Enzymsystem wies etwa ein Zehntel der Cellobiaseaktivität auf, die in einem aus Nährlösung + Mycel gewonnenen Enzympräparat enthalten war; die Cellobiase scheint demnach vorwiegend im Mycel lokalisiert zu sein. Die Cellobiaseaktivität in der Nährlösung muß aber auf Ausscheidung eines speziellen Enzyms zurückgeführt werden und kann nicht durch mangelnde Spezifität der in dem Gemisch enthaltenen Oligasen erklärt werden, wie unsere späteren Versuche zeigen. Die Cellobiase ist in allen Wachstumsphasen des Pilzes in der Nährlösung nachzuweisen. Das aus der Nährlösung bereitete Enzymsystem eignet sich zum Studium des Cellodextrin- und Cellooligosaccharidabbaus, da hier auftretende niedermolekulare Zwischenprodukte infolge der geringen Cellobiaseaktivität wesentlich langsamer weiterreagieren und so der Analyse zugänglich sind.

Bei den Präparationen wurde die Aktivität dadurch gemessen, daß die zunehmende Reduktionswirkung des Reaktionsgemisches aus Zucker und Enzym festgestellt wurde; es diente dazu die Wallenfelsche Methode der Triphenyltetrazolium-Reduktion. Diese Methode sowie die Verfahren der Papierchromatographie, der Phosphatbestimmung und der Kohlenhydratpräparation sind in der vorhergehenden Arbeit beschrieben (WEIGL 1961).

Versuchsergebnisse

I. Abbau von Cellulose

Radioaktive Cellulose mit einer Aktivität von etwa 20000 IPM¹ wurde in 1 ml m/10 Acetatpuffer (pH 5) suspendiert und mit 0,5 ml aus der Nährlösung bereiteter „Cellulaselösung“ versetzt. Je 0,5 ml der Reaktionslösung wurden nach Inkubationszeiten (bei 30°C) von 0; 2 und 6 Std

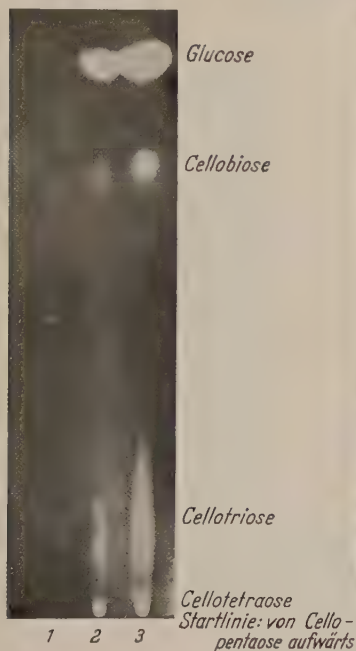


Abb. 1

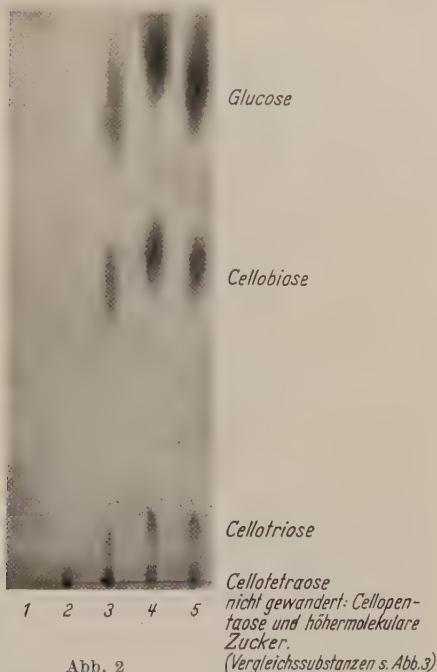


Abb. 2

Abb. 1. Abbau radioaktiver, umgefällter Cellulose durch ein Enzymsystem aus der Nährlösung von *Merulius lacrymans*. Autoradiogramm. 1, 2, 3 = Abbauphasen. Versuchsbeschreibung im Text

Abb. 2. Zeitlicher Verlauf des Cellodextrinabbaus durch ein aus dem Kulturfiltrat von *Merulius lacrymans* gewonnenes, an Cellobiase relativ armes Enzymsystem. 1 = 0, 2 = 5, 3 = 30 min, 4 = 1 Std, 5 = 2 Std Reaktionsdauer. (48 Std absteigend in Butanol/Pyridin/Wasser; mit Benzidin/Trichlor-essigsäure besprüht)

(1, 2, 3 in Abb. 1) in einem Wasserbad 10 min auf 100°C erhitzt, mit Ionenaustauschern der Ionen entleigt, zentrifugiert, das Überstehende durch Gefriertrocknen eingengt und zur Chromatographie verwendet. Es wurde dreimal je 24 Std in n-Butanol/Dimethylformamid/Wasser (2:1:1) aufsteigend chromatographiert und das Chromatogramm 14 Tage mit Röntgenfilm exponiert.

Abb. 1 zeigt das Autoradiogramm. Es ist ersichtlich, daß beim Abbau der Cellulose zuerst (Stadium 2) in großer Menge langkettige, chromatographisch nicht wandernde Produkte entstehen (wobei unser Verfahren

¹ Impulse pro Minute.

nur die wasserlöslichen Substanzen erfaßt), während die niedermolekularen Abbauprodukte (Glucose, Cellobiose, Cellotriose, Cellotetraose) noch in relativ geringer Konzentration vorliegen. Da diese niedermolekularen Zucker in Abbauphase 3 gegenüber Phase 2 noch erheblich zugenommen haben, muß man damit rechnen, daß diese Substanzen erst sekundär beim Abbau mittellanger Ketten entstehen. Dies ist auch beim Abbau hochmolekularer Cellodextrine deutlich geworden (vgl. Abb.2).

II. Mechanismus des Cellodextrinabbaus

1 ml der cellobiasearmen Enzymlösung wurde mit 4 ml m/10 Acetatpuffer (p_H 5), der 0.5% bei 4% Äthanol gefällte Cellodextrine¹ enthielt, bei 30°C inkubiert. Nach Zeitintervallen von 0, 5, 30 min, 1 und 2 Std (entspricht in Abb.2 den Phasen 1, 2, 3, 4, 5) wurden 1-ml-Portionen entnommen und in diesen durch Aufkochen die Reaktion gestoppt. In allen Proben wurde dann eine Äthanolkonzentration von 20% eingestellt (1 Std, 20°C) und 5 min bei 3000 · g zentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wurde nach vorhergehender Entsalzung durch Ionenaustauscher (siehe oben) zur Papierchromatographie verwendet. Da die Cellodextrine ursprünglich durch Fällung mit 4% Alkohol präpariert wurden, fiel bei einer Alkoholkonzentration von 20% alles der Inkubationslösung zugesetzte und während der Reaktion unverändert gebliebene Dextrinmaterial restlos aus (Abb.2; 1); nur die im Laufe der Reaktion gebildeten, kürzerkettigen Kohlenhydrate blieben in Lösung. Es ist weiter zu erkennen, daß die ersten Spaltprodukte höhere Oligosaccharide und in 20% Alkohol lösliche Cellodextrine sind (Abb.2; 2). Cellotetraose tritt bereits in nachweisbaren Mengen auf (Nachweis mit Benzidin/Trichloressigsäure), Cellobiose und Glucose sind nicht zu erkennen. Diese Zucker zeigen sich erst in späteren Abbauphasen (Abb.2; 3,4,5), was darauf hinweist, daß sie nicht durch terminalen Abbau der hochmolekularen Cellodextrine, sondern erst bei der Spaltung kürzerer Ketten gebildet werden.

III. Abbau der Cellooligosaccharide

In den Mechanismus des Cellooligosaccharidabbaus konnte auf analoge Weise Einblick gewonnen werden, wie dies beim Cellodextrinabbau beschrieben wurde, nämlich durch chromatographische Analyse der in bestimmten Abbauphasen vorliegenden Zwischenprodukte. Abb.3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Spaltung von Cellohexaose. Das in die Nährlösung ausgeschiedene und durch Fällung gewonnene Enzymsystem katalysiert einen schnellen Hexaoseabbau, wobei sehr früh und mengenmäßig überwiegend Cellobiose und Cellotetraose auftreten, während

¹ Nach STAUDINGER (1937) sind Cellodextrine bis zu einem Polymerisationsgrad von 100 in Wasser leicht, bis zu einem Polymerisationsgrad von 500 nach vorhergehender Quellung zögernd löslich. Bei einer Alkoholkonzentration von 4% werden nur die längstkettigen Dextrine gefällt.

Cellotriose in allen Phasen in relativ geringer Menge vorliegt und auch Glucose erst nach längerer Reaktionsdauer auftritt. Es läßt sich nicht sagen, wieweit die Cellotriose aus der Hexaosespaltung, aus der Cello-tetraosespaltung oder aus Transglucosidierungsvorgängen bei der Cellobiosespaltung entsteht.

Cellotetraose wird durch das extracelluläre Enzymsystem (Abb.4) wesentlich langsamer abgebaut als durch ein Enzymsystem, das durch

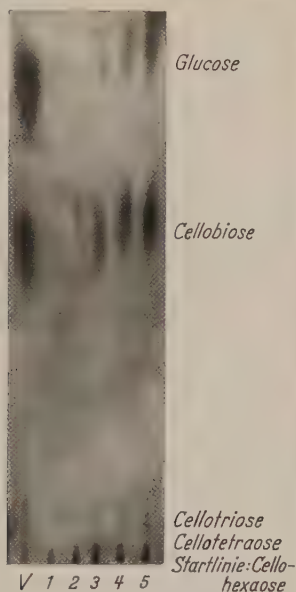


Abb. 3

Abb. 3. Zeitlicher Verlauf des Cellohexaoseabbaus durch ein extracelluläres Enzymsystem von *Merulius lacrymans*. V Vergleichssubstanzen; Reaktionsdauer: 1 = 2, 2 = 6, 3 = 10, 4 = 20, 5 = 40 min. (48 Std absteigend in Butanol/Pyridin/Wasser chromatographiert; mit Anilinchthalat besprüht)

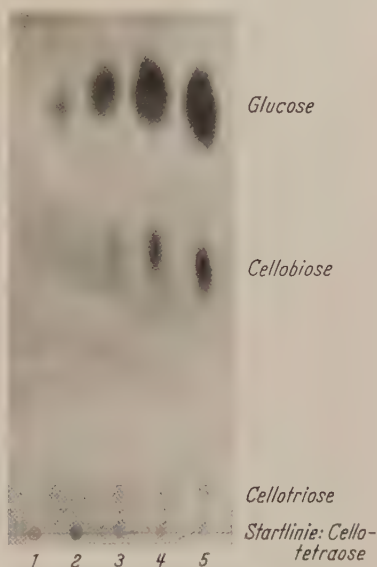


Abb. 4

Abb. 4. Abbau der Cellotetraose durch ein extracelluläres Enzymsystem aus *Merulius lacrymans*. Reaktionsdauer: 1 = 5, 2 = 30, 3 = 45, 4 = 60, 5 = 90 min. (42 Std absteigend in Butanol/Pyridin/Wasser chromatographiert; mit Anilinchthalat besprüht)

Aufarbeitung der Hyphen gewonnen wurde. In beiden Fällen gewinnt man jedoch das gleiche Bild des Abbaumechanismus: es handelt sich zweifellos um überwiegende Abspaltung von Glucose. Die im Laufe der Reaktion auftretende Cellobiose resultiert sicherlich zum großen Teil aus der Cellotriosespaltung; Spaltung der Cellotetraose in zwei Cellobiose-moleküle dürfte eine untergeordnete Rolle spielen und ist, wenn überhaupt vorhanden, vom Abbau durch Glucoseabspaltung überdeckt. Das geht aus dem zeitlichen Verlauf des Abbaus deutlich hervor (Abb.4).

In bestimmten Phasen des Oligosaccharidabbaus tritt ein chromatographisch vor der Cellotriose laufender Zucker auf (in Abb.4; 4 schwach erkennbar, auf Originalchromatogrammen deutlich, mit allen auf Zucker

spezifischen Sprühreagentien nachweisbar). Die Konstitution des Zuckers wurde noch nicht ermittelt: der Befund deutet jedoch vielleicht auf gruppenübertragenden Charakter der beteiligten Enzyme hin.

IV. Mechanismus der Cellobiosespaltung

SMITH (1949) nahm auf Grund von Kulturversuchen an, daß die Cellobiose durch *Merulius lacrymans* phosphorolytisch gespalten würde: es gelang ihr nicht, den Pilz auf Cellobiose ohne Zusatz von Adenosinmonophosphat erfolgreich zum Wachsen zu bringen. Wir stellten nun fest, daß

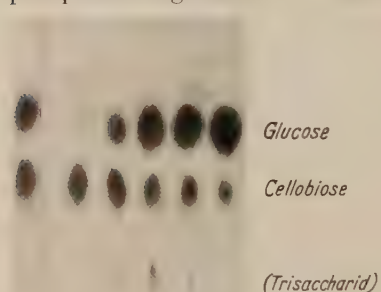


Abb. 5. Hydrolyse der Cellobiose durch ein Enzympräparat aus *Merulius lacrymans*. Beschreibung im Text. V Vergleichssubstanzen (Glucose und Cellobiose); 1—5 = Abbauphasen. (24 Std in Butanol/Dimethylformamid/Wasser aufsteigend chromatographiert)

Merulius lacrymans auf eingangs angegebener Nährlösung mit 1—4% Cellobiosegehalt schnell und dauerhaft wächst. Versuche mit phosphatfreier Enzymlösung in Acetatpuffer (m/10, pH 5) zeigen, daß *Merulius lacrymans* ein Enzym enthält, welches Cellobiose hydrolytisch zu Glucose spaltet (Abb. 5). Bei der Cellobiosespaltung treten vorübergehend Spuren eines Trisaccharids auf (Abb. 5; 3).

Bei der enzymatischen Spaltung der Cellobiose in m/10 Phosphatpuffer (pH 5) konnten wir keine Abnahme des anorganischen Phosphats feststellen. Somit scheidet auch die an sich berechnete Denkmöglichkeit einer fakultativen phosphorolytischen

Cellobiosespaltung aus. (Eine Cellobiose-Phosphorylase wurde z.B. von SHU u. Mitarb., 1957, bei *Clostridium thermocellum* nachgewiesen.) Beim weiteren Abbau der Glucose sind Pentosen als Intermediärprodukte wahrscheinlich, da aus Mycel chromatographisch nachweisbare Mengen dieser Zucker zu gewinnen sind.

Diskussion

Es wird immer schwer sein, den enzymatischen Abbau nativer Cellulose zu erforschen: die Gründe dafür legen JAYME u. Mitarb. (1938, 1943) dar. Die experimentellen Untersuchungen beschränken sich daher auf umgefällte und teilweise abgebaute Cellulose. Unsere Versuche zeigen, daß der enzymatische Abbau von hochpolymeren (bei 4% Äthanol gefällten) Cellodextrinen und von umgefällter Cellulose durch ein von *Merulius lacrymans* ausgeschiedenes Enzymsystem nicht ein terminales „Abbröckeln“ von Cellobiose- oder Glucoseeinheiten ist, wie es für andere Objekte beschrieben wurde (NISIZAWA 1955; PREECE 1957) und wie es auch für den Abbau von Cellodextrinen durch *Stachybotrys*-, „Cellobiase“

zutrifft (JERMYN 1957). *Merulius lacrymans* besitzt eine Cellulase, die eine primäre Spaltung in oligomere, chromatographisch nicht wandernde Einheiten katalysiert. An zahlreichen anderen Objekten wurde ein entsprechender Abbaumechanismus festgestellt (WALSETH 1952; HUSEMANN 1954; WHITAKER 1956).

Erst bei der Spaltung der niedermolekularen Ketten (geprüft wurde Cellohexaose) tritt Cellobiose auf. Da bei der Cellohexaosespaltung gewisse statistische Gesetzmäßigkeiten vorzuliegen scheinen (überwiegendes Auftreten von Cellobiose und Cellotetraose gegenüber Cellotriose) ist Vorsicht geboten, die Art des Cellooligosaccharidabbaus als „Zufallsmechanismus“ zu bezeichnen (WHITAKER 1957). PAZUR u. BUDOVICH (1956) haben nachgewiesen, daß beim Abbau der Maltopentaose und Maltohexaose durch Speichelamylase entgegen der früheren Annahme eines Zufallsmechanismus bevorzugt die zweite Bindung — vom reduzierenden Ende aus gezählt — gespalten wird. Es ist durchaus denkbar und experimentell nicht widerlegt, daß nicht nur beim Abbau von Cellooligosacchariden, sondern auch beim Abbau von Cellodextrinen ähnliche Gesetzmäßigkeiten wirksam sind.

Eine Untersuchung von GRASSMANN u. Mitarb. (1933) hat ergeben, daß beim Celluloseabbau durch *Helix* zwei Enzyme wirksam sind, eine Cellulase und eine Cellobiase. Auch unsere Versuche legen den Schluß nahe, daß beim extracellulären Celluloseabbau durch *Merulius lacrymans* mehrere Enzyme oder Enzymgruppen, die einen verschiedenen Abbaumechanismus katalysieren, ineinandergreifen: eine Cellulase, die die hochpolymeren Cellodextrin- und Celluloseketten zentral angreift; möglicherweise eine Oligase, die die Spaltung mittellanger Ketten bewerkstelligt und deren untere Spezifitätsgrenze nicht genau zu ermitteln war. Während jedoch Cellohexaose noch der Spaltung in die entsprechenden di- bis tetrameren Zucker unterliegt, ist Cellotetraose mehr für die „Cellobiase“ als Substrat zugänglich. Die „Cellobiase“ spaltet von Cellobiose und den niederen Homologen Glucose ab. Dem durch *Merulius lacrymans* gebildeten, cellobiosespaltenden Enzym muß entgegen der Vermutung von SMITH (1949) der Charakter einer Hydrolase zugeschrieben werden. Es mehren sich die Befunde, wonach Pilzcellobiasen hydrolysierende Enzyme mit gruppenübertragender Wirkungsweise sind, was durch vorübergehendes Auftreten von Oligosacchariden bei der Hydrolyse gezeigt wird (vgl. GIRI u. Mitarb. 1954; BUSTON u. JABBAR 1954; CROOK u. STONE 1957).

Zusammenfassung

1. Es wurde erkannt, daß der enzymatische Cellulose- und Cellodextrinabbau durch ein extracelluläres Enzymsystem von *Merulius lacrymans* keinen Abbruch endständiger Glucose- oder Cellobioseeinheiten darstellt, sondern eine zentrale Spaltung der Ketten.

2. Bei der Spaltung von Cellohexaose hingegen überwiegt das Auftreten von Cellobiose und Cellotetraose gegenüber Cellotriose; dies spricht für die Wirkung eines — wenigstens statistisch überwiegenden — Cellobiose-abspaltenden Mechanismus und gegen einen bloßen Zufallsmechanismus beim Abbau von Cellohexaose und den anderen oligomeren Zuckern.

3. Die untere Spezifitätsgrenze des hierbei wirksamen Enzyms konnte nicht genau ermittelt werden; während jedoch Cellohexaose noch überwiegend in die di- bis tetrameren Zucker gespalten wird, ist Cellotetraose bereits mehr für die „Cellobiase“ als Substrat geeignet und wird vorwiegend durch Glucoseabspaltung abgebaut.

4. Die *Merulius*-Cellobiase ist eine Hydrolase mit transglucosidierenden Eigenschaften: im Laufe ihrer Wirkung auf Cellobiose tritt vorübergehend ein Trisaccharid auf.

Die beiden Arbeiten¹ wurden teilweise mit Apparaten der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Professor Dr. H. ZIEGLER danke ich für die vortreffliche Anleitung und Unterstützung, Herrn Professor Dr. F. LYNEN und Herrn Privatdozenten Dr. L. JAENICKE, Biochemisches Institut der Universität München, für wertvolle Ratschläge.

Literatur

- BUSTON, W., and A. JABBAR: *Biochim. biophys. Acta* **15**, 543 (1954).
 CROOK, E. M., and B. A. STONE: *Biochem. J.* **65**, 1 (1957).
 GIRI, K. V., V. N. NIGAM and K. S. SRINIVASAN: *Nature (Lond.)* **173**, 953 (1954).
 GRASSMANN, W., L. ZECHMEISTER, G. TOTH u. R. STADLER: *Ann.* **503**, 167 (1933).
 HUSEMANN, E.: *Papier* **8**, 157 (1954).
 IMSCHENEZKI, A. A.: *Mikrobiologie der Cellulose*. Berlin: Akademie-Verlag 1958.
 JAYME, G., u. R. WETTSTEIN: *Papier-Fabr.* **36**, 519 (1938).
 JAYME, G., u. G. HANKE: *Cellulosechem.* **21**, 127 (1943).
 JERMYN, M. A.: *Science* **125**, 12 (1957).
 MILLER, G., and R. BLUM: *J. biol. Chem.* **218**, 131 (1956).
 NISIZAWA, I.: *J. Biochem. (Tokyo)* **42**, 825 (1955).
 NORD, F. F., and J. C. VITUCCI: *Advanc. Enzymol.* **8**, 253 (1948).
 NORKRANS, B., u. G. B. RANBY: *Physiol. Plantarum (Copenh.)* **9**, 198 (1956).
 PAZUR, J. H., and T. BUDOVICH: *J. biol. Chem.* **220**, 25 (1956).
 PREECE, J. A.: *Cereal Carbohydrates*. Royal Institute of Chemistry Publ. No. 2 (1957).
 REESE, E. T., and W. GILLIGAN: *Arch. Biochem.* **45**, 74 (1953).
 REESE, E. T., u. H. S. LEVINSON: *Physiol. Plantarum (Copenh.)* **5**, 345 (1952).
 SCHAEFER, A. C.: *Ber. schweiz. bot. Ges.* **67**, 218 (1957).
 SIH, CH. J., N. M. NELSON and R. H. MCBEE: *Science* **126**, 1116 (1957).
 SIU, R. G. H., and E. T. REESE: *Bot. Rev.* **19**, 377 (1953).
 SMITH, V. M.: *Arch. Biochem.* **23**, 446 (1949).
 STAUDINGER, H.: *Svensk. kem. T.* **49**, 3 (1937).
 THOMAS, R., and D. R. WHITAKER: *Nature (Lond.)* **181**, 715 (1958).
 WALSETH, C. S.: *Tappi* **35**, 233 (1952).
 WEIGL, J.: *Arch. Mikrobiol.* **38**, 350 (1961).
 WHITAKER, D. R.: *Arch. Biochem.* **43**, 253 (1953).
 WHITAKER, D. R.: *Canad. J. Biochem.* **34**, 488 (1956); **35**, 733 (1957).

¹ Vgl. WEIGL (1961).

Autorenverzeichnis

- BACHMANN, E., und H. ZÄHNER, Stoffwechselprodukte von Actinomyces. 28. Mitteilung. Die „in vitro“-Resistenz gegen Ferrimycin. S. 326
- CANTINO, E. C., and G. TURIAN, A Role for Glycine in Light stimulated Nucleic Acid Synthesis by *Blastocladiella emersonii*. S. 272
- GOTTSCHALK, G., s. SCHLEGEL, H. G., und H. KALTWASSER. S. 209
- HÜTTER, R., Zur Systematik der Actinomyces. 5. Die Art *Streptomyces albus* (Rossi-Doria emend. Krainisky) Waksman et Henrici 1943. S. 367
- KALTWASSER, H., s. SCHLEGEL, H. G., und G. GOTTSCHALK. S. 209
- KREMPL-LAMPRECHT, L., Über die Besiedelung der Autolyseprodukte des Echten Hausschwamms durch Successionspilze aus der Gattung *Scopulariopsis*. I. Teil. S. 384
- LAFFERTY, R., s. SCHLEGEL, H. G. S. 52
- , s. SCHLEGEL, H. G., und R. STELLMACH-HELWIG. S. 55
- MACHER, F., und E. MANNINGER, Die Verwendung der Spektrochemie zur Bestimmung der Zusammensetzung von Bakterien. S. 201
- MANNINGER, E., s. MACHER, F. S. 201
- NATHAN, H. A., Effect of Nutritional Deficiencies on Synthesis of the Inducible Malic Enzyme of *Lactobacillus plantarum*. S. 107
- PFENNIG, N., s. SCHLEGEL, H. G. S. 1
- PRELL, H., Analyse des Lysogenisierungsvorganges im System *Salmonella typhimurium*-Phage P 22 mit Hilfe von UV-Bestrahlung. S. 171
- RÖSCH, R., Untersuchungen über den Ligninabbau und über die Oxydasen von Braun- und Weißfäulepilzen. S. 73
- RYDIN, C., Studies on Fermentation Processes in Silage. Malts as a Supplement in Biological Ensiling. S. 156
- SALAMA, A. M., s. TOLBA, M. K. S. 283 und 289
- SCHLEGEL, H. G., und N. PFENNIG, Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien. S. 1
- , und R. LAFFERTY, Radioaktivitätsmessung an Einzellern auf Membranfiltern. S. 52
- SCHLEGEL, H. G., R. LAFFERTY und R. STELLMACH-HELWIG, Quantitative Messungen über den CO_2 -Einbau an organotrophen Bakterien. S. 55
- , H. KALTWASSER und G. GOTTSCHALK, Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. S. 209
- SCHMIDT, K., Ein atypischer Stamm von *Pseudomonas iodinum*. S. 408
- SIEFERT-GRETCHMAN, G., Studien über die Adsorption und Injektion von durch Protamin inaktivierten T 5-Phagen. S. 223
- SKINNER, F. A., and N. WALKER, Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. S. 339
- SPRECHER, E., Über die Stoffausscheidung bei Pilzen. I. S. 114
- , Über die Stoffausscheidung bei Pilzen II. Die Ausscheidung sekundärer Stoffwechselprodukte. S. 299
- STELLMACH-HELWIG, R., Morphologische und physiologische Eigenschaften einiger aus Schafpannen isolierter Bakterienstämme. S. 40
- , s. SCHLEGEL, H. G., und R. LAFFERTY. S. 55
- TOLBA, M. K., and A. M. SALAMA, Effect of Dihydrostreptomycin on the Growth and Carbohydrate Metabolism of Mycelial Mats of *Rhizoctonia solani*. S. 283
- , —, On the Mechanism of Sucrose Utilisation by Mycelial Felts of *Rhizoctonia solani*. II. Effects of Glucose, Fructose, Silver Nitrate, Sodium Fluoride and Preheating of Mycelial Mats on Sucrose Utilisation. S. 289
- TURIAN, G., s. CANTINO, E. C. S. 272
- WALKER, N., s. SKINNER, F. A. S. 339
- WEIGL, J., Über den Stoffwechsel und die Cellulosesynthese von *Acetobacter xylinum* (Brown) Holland. S. 350
- , Zum Mechanismus des enzymatischen Celluloseabbaus durch *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr. S. 411
- ZÄHNER, H., s. BACHMANN, E. S. 326
- ZETSCHKE, K., Chemisch-Physiologische Untersuchung über die Hydroxylierung von Steroiden durch Pilze der Gattung *Curvularia*. S. 237

